

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS
RECEPTORES “*TOLL-LIKE*” EN LA GRAVEDAD DE LA
RECIDIVA VIRAL Y EN LA INCIDENCIA DEL RECHAZO AGUDO
EN PACIENTES CON TRASPLANTE HEPÁTICO POR CIRROSIS
POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C**

TESIS DOCTORAL

ANA MARÍA DUCA

MADRID, 2014

ANA MARÍA DUCA

TITULO: INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS RECEPTORES “*TOLL-LIKE*” EN LA GRAVEDAD DE LA RECIDIVA VIRAL Y EN LA INCIDENCIA DEL RECHAZO AGUDO EN PACIENTES CON TRASPLANTE HEPÁTICO POR CIRROSIS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C.

DIRECTORES: **Prof. D. VALENTÍN CUERVAS-MONS MARTÍNEZ,** CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID, JEFE DE SERVICIO DE MEDICINA INTERNA Y JEFE DE LA UNIDAD DE TRASPLANTE HEPÁTICO DEL HOSPITAL PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA.

Dra. Dña MARÍA JESÚS CITORES SÁNCHEZ, DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, DOCTORA CONTRATADA POR EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA Y PROFESOR HONORARIO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

2014

**A mis padres,
a mi hermano.**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en la Unidad de Trasplante Hepático y en el Laboratorio de Medicina Interna del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda. Ha sido subvencionada por el Proyecto de Investigación del Instituto de Salud Carlos III (PI08/1561) y por una Beca Predoctoral de la Cátedra de Trasplantes de UAM-ROCHE, y forma parte de las actividades de la Cátedra UAM-Fundación Lair “Docencia e investigación en enfermedades sistémicas de base inmunológica”.

Agradecimientos

Al acabar de escribir esta tesis doctoral, es inevitable pensar en el camino recorrido, con todas sus dificultades, incertidumbres, pero también con momentos de alegría y satisfacción. Esta aventura no hubiese sido posible sin el apoyo, participación, comprensión y colaboración de mucha gente, que me ha guiado y ayudado, no solo desde punto de vista científico, sino también personal, facilitando de esta forma llevar a cabo este trabajo. Por ello, es para mí un placer, llegado este momento, poder utilizar este espacio para expresarles mis agradecimientos.

En primer lugar quiero agradecer de manera especial y sincera al Profesor Valentín Cuervas-Mons, por haber querido compartir esta aventura conmigo y por haber estado siempre ahí cuando le he necesitado. Su apoyo incondicional, su confianza en mí, incluso cuando ni yo me creía capaz de finalizar este trabajo, su optimismo, su actitud de no rendirse nunca ante las dificultades y su gran capacidad en guiar mis ideas han sido un aporte de incalculable valor no solo en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como médico y como persona. Le agradezco también el haberme facilitado siempre todos los medios que he necesitado para poder llevar a cabo esta tesis. Muchas gracias Profesor.

También quiero agradecerle a la Dra. María Jesús Citores, su apoyo continuo, perseverancia y su insistencia sin las cuales esto se habría eternizado. Su orientación y su participación activa para la realización de esta tesis han sido fundamentales. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y su paciencia que hicieron posible que nuestras ideas, desde nuestros diferentes puntos de vista, redundaran tanto a nivel científico como personal. Muchas gracias María Jesús.

Quiero expresar mi gratitud a todos “mis maestros” del antiguo Servicio de Medicina Interna III, Dr. Fernando Martín, Dr. Teodoro Martín, Dr. Antonio Ramos, Dr. Vicente Masip, Dr. Alberto Roldán, Dr. Alfonso Moreno que me han enseñado tanto durante mi periodo de formación como residente y que han puesto los cimientos de lo que soy hoy como médico. Muchas gracias.

Para seguir, me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización de este presente trabajo.

A Sara por su colaboración en la realización de esta tesis.

A la Dra. Portero por su paciencia y por su ayuda en la búsqueda de datos de microbiología.

A la Dra. Clara Salas por su disponibilidad y colaboración en la interpretación de las muestras de anatomía-patológica.

A Carlos Vilches por colaborar en la obtención de muestras de ADN.

A Noelia por tantos buenos y malos momentos que hemos compartido.

A todos mis compañeros que disfrutan conmigo haciendo medicina.

A los pacientes que me enseñan más que nadie cada día y que me recuerdan que sin ellos esto no tendría sentido.

Antes de terminar, me gustaría dedicarle un agradecimiento especial a la Dra. Baños. Si, a la doctora, porque aunque en el día a día eres simplemente Lina, quería aprovechar estas líneas para decirte que de ti aprendo todos los días a ser mejor médico. Gracias por tu sensibilidad, por entenderme durante estos años y por apoyarme de forma incondicional para la realización de esta tesis.

Por último y no menos importante, me gustaría agradecer a mis padres y a mi hermano que siempre me han apoyado en todos mis proyectos y a mis amigos Cristina y Ricardo por todo lo que han hecho para que yo pudiera acabar esta tesis.

Abreviaturas

Ac. anti-IL2: Anticuerpos anti-IL2

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

AZT: Azatioprina

CMV: Citomegalovirus

ICN: Inhibidores de la calcineurina

IC95%: Intervalo de confianza al 95%

IFN: Interferón

IL: Interleucina

IMC: Índice de masa corporal

MMF: Micofenolato de mofetilo

NK: *Natural killer* (célula asesina natural)

OR: Odds ratio

p: Probabilidad

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

TLR: *Toll-like* receptor

TNF: Factor de necrosis tumoral

Índice

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| I. EPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) | 1 |
| Distribución geográfica de los genotipos del VHC..... | 1 |
| Vías de transmisión del VHC..... | 2 |
| Historia natural e impacto de la infección crónica por VHC..... | 3 |
| II. TRASPLANTE HEPÁTICO Y LA RECIDIVA DE LA INFECCIÓN CRÓNICA POR VHC..... | 5 |
| Historia natural de la recidiva de la infección por VHC | 5 |
| Origen de la infección y la cinética viral postrasplante..... | 5 |
| Recidiva de la infección por VHC sobre el injerto..... | 6 |
| Supervivencia de los pacientes trasplantados por cirrosis por VHC.. | 7 |
| Factores de riesgo asociados con la gravedad de la recidiva del VHC.. | 9 |
| Factores relacionados con el donante..... | 9 |
| Factores dependientes del procedimiento quirúrgico..... | 10 |
| Factores virales..... | 10 |
| Factores dependientes del receptor..... | 11 |
| Parámetros analíticos y tipo de recidiva histológica en el primer año postrasplante..... | 12 |
| Complicaciones biliares..... | 12 |
| Inmunosupresión..... | 13 |
| Monitorización de la recidiva del VHC postrasplante..... | 14 |
| III. LOS RECEPTORES <i>TOLL-LIKE</i> (TLRs) EN LA INFECCIÓN POR VHC Y EN EL RECHAZO AGUDO..... | 16 |
| Características generales de los TLRs..... | 16 |
| TLRs y la infección crónica por VHC: respuesta inmunológica, mecanismos de activación y de evasión inmune..... | 18 |
| Mecanismos de respuesta inmunológica frente al VHC..... | 18 |
| Mecanismos de activación inmune frente al VHC dependientes de los TLRs..... | 19 |
| Mecanismos de evasión inmune del VHC dependientes de los TLRs..... | 20 |

| | |
|---|-----------|
| Los polimorfismos de los TLRs en la infección crónica por VHC y en el trasplante hepático por cirrosis por VHC..... | 21 |
| Papel de los TLRs en el rechazo agudo en el trasplante hepático por cirrosis por VHC..... | 22 |
| HIPÓTESIS..... | 24 |
| OBJETIVOS..... | 25 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 26 |
| I. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO..... | 26 |
| Diseño del estudio y población estudiada..... | 26 |
| II. VARIABLES ANALIZADAS..... | 27 |
| Datos clínicos..... | 27 |
| Definiciones de las variables analizadas..... | 27 |
| Recidiva de la infección y de la enfermedad por VHC..... | 27 |
| Gravedad de la recidiva..... | 27 |
| Rechazo agudo del injerto..... | 28 |
| Enfermedad por citomegalovirus..... | 28 |
| III. METODOLOGIA..... | 29 |
| Recogida de muestras..... | 29 |
| Selección y análisis de polimorfismos..... | 29 |
| IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 31 |
| RESULTADOS..... | 32 |
| I.CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA..... | 32 |
| Características demográficas y clínicas..... | 32 |
| Régimen inmunosupresor..... | 34 |
| Distribución de los polimorfismos genéticos de los TLRs | 35 |
| II.RECIDIVA DEL VHC: INCIDENCIA, GRAVEDAD, FACTORES DE RIESGO Y SUPERVIVENCIA DEL INJERTO..... | 37 |
| Factores relacionados con el donante | 37 |
| Tiempo de isquemia fría..... | 39 |

| | |
|--|-----------|
| Factores relacionados con el receptor..... | 39 |
| Factores virales..... | 40 |
| Complicaciones biliares y vasculares..... | 40 |
| Factores relacionados con la inmunosupresión..... | 40 |
| Polimorfismos genéticos de los TLRs..... | 42 |
| Factores de riesgo de recidiva grave del VHC en el análisis multivariante..... | 45 |
| Supervivencia del injerto..... | 46 |
| Supervivencia del injerto según la gravedad de la recidiva grave..... | 46 |
| Supervivencia según los factores de riesgo de recidiva grave..... | 47 |
| Supervivencia del injerto según el tratamiento antiviral..... | 48 |
| III. RECHAZO AGUDO: INCIDENCIA Y FACTORES DE RIESGO..... | 49 |
| Factores relacionados con el receptor..... | 49 |
| Factores relacionados con el donante..... | 51 |
| Tiempo de isquemia fría..... | 52 |
| Factores relacionados con la inmunosupresión..... | 53 |
| Polimorfismos genéticos de los TLRs..... | 54 |
| Factores de riesgo del rechazo agudo en el análisis multivariante..... | 56 |
| DISCUSIÓN..... | 57 |
| I. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS TLRs Y GRAVEDAD DE LA RECIDIVA DEL VHC DESPUÉS DEL TRASPLANTE HEPÁTICO..... | 60 |
| II. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS TLRs Y RECHAZO AGUDO..... | 62 |
| III. LIMITACIONES DEL TRABAJO Y APLICABILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS..... | 65 |
| RESUMEN..... | 66 |
| I. RESUMEN..... | 66 |
| II. SUMMARY..... | 69 |
| CONCLUSIONES..... | 71 |
| Conclusiones relacionadas con la recidiva grave del VHC | 71 |
| Conclusiones relacionadas con el rechazo agudo..... | 71 |

| | |
|--------------------------|-----------|
| BIBLIOGRAFÍA..... | 72 |
|--------------------------|-----------|

Introducción

I. EPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)

La infección crónica por el VHC es la causa principal de hepatitis crónica, cirrosis y hepatocarcinoma, así como la indicación más frecuente de trasplante hepático en el mundo occidental. Es una infección endémica y constituye un problema de salud mundial con una prevalencia global de 2-3%, oscilando desde una prevalencia baja (<2,5%) en América del Norte, Europa Occidental y Australia, a prevalencia intermedia (2,5%-10%) en algunos países Mediterráneos, América de Sur, Europa del Este, África y Oriente Medio, para alcanzar una prevalencia alta (>10%) en Egipto, Burundi, Gabón, Camerún, Ruanda, Bolivia, Mongolia y Guinea (1-3).

Se estima en 160 millones el número de personas infectadas de forma crónica por el VHC, de los que el 20% evolucionará a cirrosis y el 1-5% desarrollará cada año hepatocarcinoma, con una mortalidad anual global de 350 000 personas (2,4).

En Europa, la prevalencia global oscila entre 0,4-3,5% (4), con una amplia variación según las diferentes regiones analizadas, siendo inferior a 0,5% en los países del norte de Europa y superior a 3% en Rumanía, áreas rurales de Grecia, Italia y Rusia (5,6). España se sitúa entre los países europeos con mayor prevalencia, oscilando entre 1,6-2,6% de la población adulta (7). Los movimientos migratorios y el incremento de la adicción a drogas parenterales, especialmente en los países de Europa del Este, están contribuyendo a que se modifique el mapa epidemiológico del VHC en Europa.

Distribución geográfica de los genotipos del VHC

El VHC es un pequeño virus formado por ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla positiva, que pertenece al género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae*. Mediante el análisis comparativo de las secuencias genómicas del VHC aislados en diferentes zonas geográficas, se han podido identificar hasta 7 genotipos denominados del 1 al 7 según el orden de descubrimiento. Cada uno de estos genotipos está dividido en subtipos, identificados mediante letras, por ejemplo, 1a, 1b, etc (8).

El genotipo 1 es el más frecuente en todo el mundo, siendo el genotipo 1b el más frecuente en Europa y el genotipo 1a el más frecuente en EEUU (4). El genotipo 3a tiene mayor prevalencia entre los usuarios de drogas por vía parenteral europeos y últimamente en este grupo de riesgo está aumentando la incidencia del genotipo 4. El genotipo 2 ha sido identificado y es frecuente en la región Mediterránea, mientras que los genotipos 5 y 6 son infrecuentes en Europa (8). El genotipo 7 ha sido identificado en pacientes de Canadá y Bélgica, probablemente infectados en África Central (9).

En España, el genotipo predominante es el genotipo 1 (65%), fundamentalmente el subtipo 1b, seguido del genotipo 3 (20%), genotipo 4 (11%) y son poco frecuentes los genotipos 2 (3%) y 5 (0,3%) (7,10). El incremento en los últimos años del genotipo 4 parece relacionarse con la inmigración. El conocimiento del genotipo viral es fundamental para decidir la pauta de tratamiento, mientras que el subtipo parece tener implicaciones en la aparición de resistencias a los nuevos fármacos y con sus resultados.

Vías de transmisión del VHC

Similar a otros virus de transmisión parenteral, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis B (VHB), la transmisión del VHC requiere la exposición percutánea a sangre infectada.

Antes del descubrimiento del VHC en 1989, la transfusión de sangre y hemoderivados fue la principal vía de transmisión en Europa, con una incidencia del 5-13%. Se estima que ésta fue la vía de adquisición en aproximadamente 70% de los casos diagnosticados en los países desarrollados. Desde entonces, y con la implementación de métodos de cribado sistemático de todos los productos sanguíneos en los bancos de sangre, los casos relacionados con la trasfusión sanguínea prácticamente han desaparecido en la actualidad, con una incidencia inferior a 1% (11).

Los usuarios de drogas por vía parenteral o nasal representan actualmente la principal fuente de transmisión, especialmente en los países más desarrollados, debido a uso compartido de jeringas contaminadas o de sistemas de inhalación con sangrado frecuente de la mucosa nasal. La

prevalencia de la infección puede llegar hasta el 90% cuando se trata de pacientes adictos a drogas, coinfectados por el VIH (12).

La transmisión nosocomial por procedimientos médicos o quirúrgicos inseguros es una forma de transmisión frecuente en países en vías de desarrollo. La incidencia de transmisión mediante hemodiálisis suele ser alta, incluso en los países occidentales, siendo ligeramente superior en España que en el resto de los países europeos (19,5%)(13-15).

La transmisión vertical de madres a hijos ocurre en 3-10% de los casos, con el incremento del riesgo en mujeres con alta carga viral del VHC, coinfectadas con VIH, partos laboriosos con rotura de más de 6 horas de la membrana amniótica (16). El riesgo de transmisión sexual ha sido motivo de muchos debates y en general se considera bajo, siendo mayor en los homosexuales promiscuos, con una seroprevalencia del VHC de hasta 4-6% (16).

Otros medios de contagio menos habituales son los tatuajes, *piercing* o acupuntura realizados en establecimientos no controlados, y la exposición ocupacional a sangre contaminada tras una punción. Sin embargo, entre un 15-30% de los pacientes diagnosticados no van a presentar ningún factor de riesgo conocido de infección (16).

Estas situaciones constituyen los factores de riesgo de adquisición del VHC y van a permitir establecer la población de riesgo sobre la que aplicar las medidas de cribado del VHC.

Historia natural e impacto de la infección crónica por VHC

La infección aguda por el VHC es asintomática en el 50-90% de los casos y es responsable de sólo el 10% de los casos de hepatitis aguda diagnosticada en Europa (17). Después de la infección aguda, el 50-85% de los pacientes son incapaces de eliminar el virus y desarrollan una infección crónica por el VHC. El riesgo de cronicidad depende de la vía de transmisión, de la presencia de síntomas en la fase aguda (48-75% en sintomáticos y 85-90% en asintomáticos), la edad de adquisición de la infección (superior en mayores de 40 años) o del polimorfismo rs12979860 de interleucina (IL)-28B.

La infección crónica suele ser asintomática u oligosintomática y evoluciona de forma progresiva a diferentes grados de fibrosis hepática, hasta llegar a estadio de cirrosis en 10-40% de casos en un periodo de tiempo de 20-30 años (18). La velocidad de progresión de la fibrosis no depende del genotipo del virus ni de la carga viral. El consumo de alcohol o tabaco, la presencia de diabetes mellitus, obesidad o esteatosis hepática, la edad superior a 40 años, la raza afroamericana, la infección crónica por VIH, el uso de inmunosupresores después de un trasplante de órgano sólido u otros virus hepatotropos suelen ser factores de riesgo que aceleran la progresión de la fibrosis (4). En cambio, el consumo de café parece ser un factor protector en cuanto al desarrollo de fibrosis o la aparición de hepatocarcinoma (19,20).

La presencia de cirrosis se ha relacionado con la aparición de complicaciones derivadas de la hipertensión portal, como descompensación hidrópica, hemorragia por varices esofagogástricas, encefalopatía hepática, síndrome hepatorenal o peritonitis bacteriana espontánea. El rango de descompensación entre los cirróticos es del 4% anual.

El hepatocarcinoma es otra complicación mayor de la infección crónica por el VHC, siendo la principal causa de cáncer primario de hígado en Europa. La incidencia anual de hepatocarcinoma varía entre el 1-5%, con una probabilidad de fallecer en el primer año después del diagnóstico de 33% (21).

Los pacientes diagnosticados de hepatopatía crónica por VHC tienen una morbilidad elevada, con mayor número de ingresos hospitalarios y mortalidad 3 veces superior a la población general. La mortalidad atribuible a la infección crónica por VHC es de 2,5 muertes por 100.000 habitantes en Francia (95% con cirrosis y 33% con HCC) y de 11,25 por 100.000 habitantes en España (22).

Afortunadamente, parece que la historia natural de la infección crónica por VHC va a cambiar de forma radical en la próxima década, gracias a los nuevos tratamientos antivirales de acción directa. De momento, el trasplante hepático sigue siendo el tratamiento disponible para la enfermedad hepática terminal por VHC.

II. TRASPLANTE HEPÁTICO Y LA RECIDIVA DE LA INFECCIÓN CRÓNICA POR VHC

En el momento actual, la cirrosis por el VHC, sola o en asociación con el consumo de alcohol, es la indicación más frecuente de trasplante hepático en los países occidentales, representando el 30-50% de las indicaciones de trasplante en adultos (23). En España, según el Registro Español de Trasplante Hepático, el 36,4% de los receptores de un primer injerto hepático, entre 1984-2012, estaban infectados por el VHC (24).

Si el ARN viral es detectable en el momento del trasplante, la recurrencia de la infección sobre el injerto es universal (25-27). La progresión de la hepatitis C es más rápida que en individuos inmunocompetentes, aunque la gravedad de la recidiva es muy variable en cada individuo. Se estima que la tasa de cirrosis a los 5 años es del 20-54% (28-31) con una pérdida del injerto del 10%, siendo la recidiva de la enfermedad primaria la causa más frecuente de pérdida del injerto (29,32).

Historia natural de la recidiva de la infección por VHC

Origen de la infección y la cinética viral postrasplante

Aunque cabría esperar que una vez extraído el órgano infectado por el VHC se produciría la resolución completa de la infección, la realidad es que la recurrencia de la infección aparece en prácticamente todos los casos en los receptores virémicos, y se produce inmediatamente después de la reperusión del injerto (33). Esto ocurre porque el virus, a pesar de ser principalmente hepatotrope, se perpetúa en otros reservorios extrahepáticos, fundamentalmente en ganglios linfoides, y desde esa localización vuelven a infectar el injerto (34), junto con los viriones que forman el remanente sanguíneo (35).

El diagnóstico de la recurrencia de la infección viral es puramente virológico y se realiza mediante la detección de ARN del VHC en el suero de los pacientes, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa

(PCR). Los estudios de la cinética viral postrasplante han permitido demostrar que durante la fase anhepática se produce un descenso brusco de la carga viral (36), pero a partir de las 12-24 horas posteriores a la reperusión se inicia una replicación viral muy activa, alcanzándose los niveles máximos a los 4-5 días del trasplante, con cargas virales 10-20 veces superiores a la carga viral pretrasplante (33,37-38).

Para poder aclarar el virus, es necesaria una respuesta inmunológica rápida, vigorosa y mantenida en el tiempo, lo que sucede en el 20-50% de los pacientes inmunocompetentes y en casi ninguno de los pacientes trasplantados, en gran parte por la inmunosupresión a la que están sometidos, lo que condiciona una respuesta inmunológica débil y tardía, y como consecuencia, la persistencia viral y cronificación de la enfermedad.

Recidiva de la infección por VHC sobre el injerto

El diagnóstico de la recidiva de la hepatitis sobre el injerto se realiza mediante criterios histológicos y la gravedad de la recidiva es variable. En algunos casos la afectación histológica es leve, con escasa progresión, pero en la mayoría de los casos la evolución de la fibrosis es mucho más acelerada que en pacientes inmunocompetentes, con desarrollo de cirrosis y pérdida del injerto.

Desde punto de vista histológico existen 2 patrones diferentes de recidiva del VHC sobre el injerto:

- a) Patrón de hepatitis crónica C, similar al observado en pacientes no trasplantados, pero con una progresión más acelerada de la fibrosis y con desarrollo de cirrosis mucho antes (a los 9-12 años), respecto a los pacientes inmunocompetentes (a los 20-50 años) (29,39).
- b) Patrón de hepatitis colestásica fibrosante, poco frecuente (<10%) pero muy grave, que ocurre habitualmente en situaciones de intensa inmunosupresión. Se caracteriza por ictericia intensa, colestasis bioquímica, niveles muy altos de viremia y hallazgos histológicos muy específicos, que consisten en balonización de los hepatocitos, escasa inflamación, grado variable de proliferación colangiolar, sin pérdida de

ductos biliares y fibrosis en puentes (40). El diagnóstico histológico correcto y la exclusión de patología biliar o vascular es imprescindible para confirmar esta entidad.

Independientemente del tipo de recidiva, aproximadamente 20-54% de los pacientes desarrollan cirrosis sobre el injerto a los 5 años postrasplante (28-31). La historia natural de la cirrosis es más agresiva que en los pacientes inmunocompetentes, con un primer episodio de descompensación tras una media de 8 meses desde el diagnóstico de la cirrosis, con una tasa de descompensación del 42% y del 63% al primer y tercer año, respectivamente, frente a tan solo el 3% y el 18% en pacientes no trasplantados (39). Los factores que se asocian con alto riesgo de descompensación son: estadio Child-Pugh B ó C, albúmina sérica <3,4g/dl y el diagnóstico de cirrosis compensada en el primer año postrasplante (39). La puntuación de MELD (*Model for End-Stage Liver Disease*) superior a 16 es el factor de riesgo principal para predecir el riesgo de descompensación y de mortalidad en los receptores que desarrollan cirrosis por VHC sobre el injerto (41). La supervivencia a los 3 años de los pacientes trasplantados con cirrosis descompensada es inferior al 10%, respecto al 60% en pacientes no trasplantados (39).

Supervivencia de los pacientes trasplantados por cirrosis por VHC

La infección por VHC no repercute de forma negativa sobre la supervivencia del paciente en los primeros meses postrasplante. Sin embargo, la supervivencia a largo plazo es inferior al resto de los pacientes trasplantados por otras etiologías, con diferencias significativas del 10% o más a partir de quinto año después del trasplante hepático.

La supervivencia del receptor al primer, quinto y décimo año postrasplante, según la Memoria de resultados 2012 del Registro Español de Trasplante Hepático fue, respectivamente, del 82,9%, 67,2% y 54,7% en los pacientes trasplantados VHC-positivo frente al 87,8%, 78,7% y 67,4% en los VHC-negativo (figura 1) (24). Se estima que el riesgo de fallecimiento postrasplante es de 1,23 [intervalo de confianza al 95% (IC95%): 1,12-1,35]

veces superior en los pacientes VHC-positivo respecto a otras etiologías (32). La supervivencia del injerto disminuye de forma progresiva en los trasplantes sucesivos, con una supervivencia de 58,3% al quinto año después del primer trasplante hepático, 43.9% después del segundo y de sólo 34,7% después del tercero (24).

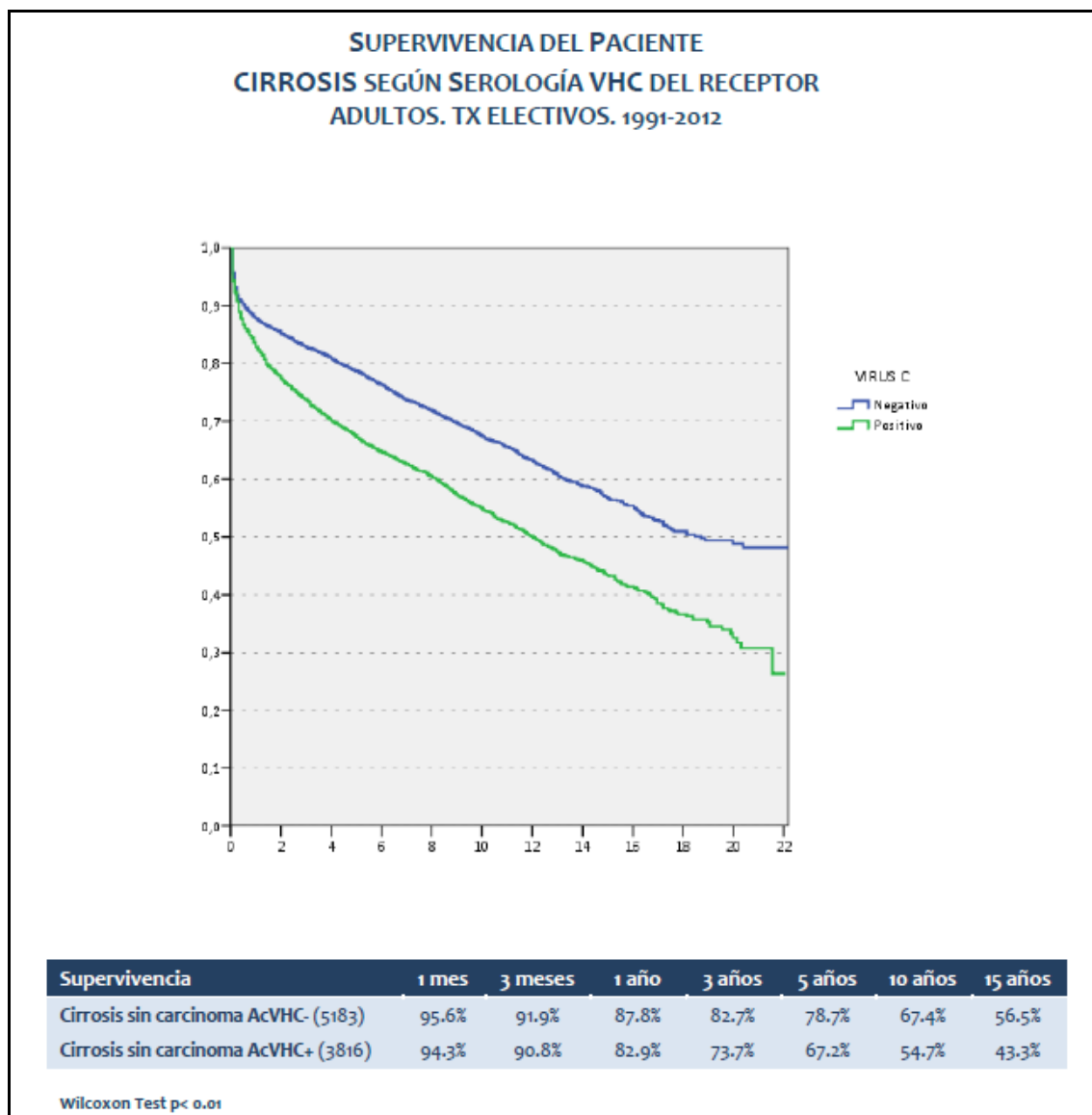


Figura 1. Supervivencia del paciente trasplantado por cirrosis por VHC respecto a los pacientes trasplantados por cirrosis no VHC entre 1991-2012 (Memoria de resultados del Registro Español de Trasplante Hepático 2012)(24)

Factores de riesgo asociados con la gravedad de la recidiva del VHC

La identificación de factores relacionados con una progresión más acelerada de la recidiva de la infección por VHC es fundamental, sobre todo si se trata de factores potencialmente modificables.

Factores relacionados con el donante

Se han analizado varios factores dependientes del donante en cuanto a la supervivencia tanto del injerto como del paciente (42). Entre ellos, el más estudiado ha sido la edad del donante, que ha demostrado ser importante en todos los receptores de trasplante hepático. No obstante, el impacto es mayor en los pacientes VHC-positivo (43).

Existen numerosos artículos publicados que demuestran que la edad avanzada del donante es un factor de riesgo independiente de recidiva grave (43-47). Los mecanismos que pudieran explicar esta relación no están muy claros, pero la supervivencia de los pacientes a los 5 años es de 53,3% para los donantes con edad entre 50-74 años y es de solo 45,2% en caso de donantes mayores de 75 años (24).

El reciente consenso sobre donantes con criterios ampliados no recomienda el uso de donantes añosos en pacientes VHC-positivo, por su repercusión negativa en el beneficio real del trasplante, aunque esta recomendación es discutible ya que puede ser perjudicial para el resto de pacientes no-VHC que recibirían injertos más añosos. El efecto negativo de la edad de donante es, sobretudo, manifiesto si se le añaden otros factores de riesgo, tales como la presencia de esteatosis, daño de preservación del injerto o tiempo de isquemia prolongado (48-50).

Estudios iniciales relacionaron el trasplante a partir de donante vivo con una peor evolución de recidiva viral, asociación que se ha visto desmentida en estudios más recientes (51). En cuanto a los donantes en asistolia, donantes vivos o el injerto *split* no existen datos suficientes para poder determinar si son o no factor de riesgo para la gravedad de la recidiva del VHC.

Otra categoría de donantes especiales son los donantes anti-VHC positivo, pero hay escasos estudios y no existe ninguna evidencia sobre su posible efecto negativo en cuanto a la gravedad de la recidiva y tampoco sobre la supervivencia del receptor (52-56). Se aceptan como donantes anti-VHC positivo, sólo los donantes con edad inferior a 50 años, con perfil hepático, ecografía abdominal y aspecto macroscópico del hígado normal, ya que fuera de estos criterios aumenta el riesgo de muerte y pérdida del injerto. Este tipo de donantes actualmente están aceptados sólo para receptores con cirrosis por VHC genotipo 1. Se recomienda minimizar el tiempo de isquemia y aunque la biopsia hepática es aconsejable, no debería de prolongar el tiempo de isquemia más de 8 horas.

Factores dependientes del procedimiento quirúrgico

El tiempo de isquemia es otro factor con impacto negativo sobre la recidiva del VHC postrasplante. Igual que en el caso de la edad del donante, es difícil de establecer el límite a partir del cual el efecto negativo sobre la supervivencia del injerto y del paciente es mayor. En general, un tiempo de isquemia superior a 12 horas es claramente perjudicial y los mejores resultados se han obtenido con tiempo de isquemia inferior a 8 horas (57-58). En el caso de los donantes en asistolia, según la base de datos de *United Network for Organ Sharing* (UNOS), un tiempo de isquemia caliente superior a 90 minutos se asocia con peor supervivencia del injerto en pacientes con cirrosis por VHC (59).

Factores virales

Existe controversia respecto al papel que desempeña el genotipo del VHC en la evolución de la recidiva viral del después del trasplante. Algunos autores, aunque no todos, han observado que el genotipo 1b (60-62) ó 4 (63) se asocian con recidiva más agresiva. Cargas virales altas a los 7 días (64), 4 meses (30) y 12 meses (65-66) después del trasplante hepático se asocian con peores resultados y con una recidiva más grave. Así mismo parece que la supervivencia del paciente se ve negativamente influenciada por la carga viral del VHC al año postrasplante (mayor de 10^8 UI/ml la supervivencia es de 12

meses, entre 10^7 y 10^8 la supervivencia es de 71 meses y menor de 10^7 la supervivencia es de 89 meses)(66).

La infección por citomegalovirus (CMV) se ha asociado en la mayoría de los estudios con mayor gravedad de la recidiva del VHC postrasplante (53, 60,67-68), una progresión más acelerada a cirrosis (50% frente a 11%) (67) y un mayor riesgo de pérdida del injerto (45% frente a 16%) (45) en comparación con los pacientes sin infección por CMV, aunque esta asociación no se ha podido demostrar en otros estudios (69-70). Aún así, parece razonable la monitorización estrecha de la infección por CMV para iniciar tratamiento precozmente.

Factores dependientes del receptor

Al año postrasplante, aproximadamente el 50% de los pacientes trasplantados por cirrosis por VHC presentan síndrome metabólico, que es un factor de riesgo demostrado para la progresión más acelerada de la fibrosis (71). Además, la prevalencia de diabetes mellitus *de novo* es mayor en los pacientes VHC-positivo que en los pacientes VHC-negativo. Tanto la diabetes como, de forma más general, la resistencia a la insulina, son factores que se asocian con una progresión más rápida de la fibrosis, aumentando 3,3 veces el riesgo de desarrollo de cirrosis a los 6 años, riesgo que se incrementa a 8,4 veces en caso de asociarse con una edad del donante superior a 55 años (72).

Otros factores relacionados con el receptor son los factores genéticos. Recientemente se ha demostrado la fuerte asociación entre la variación de un nucleótido del gen IL28B que codifica el interferón (IFN)- λ con la historia natural de la hepatitis C y la respuesta al tratamiento antiviral con IFN y ribavirina, tanto en pacientes trasplantados como en no trasplantados. El genotipo CC del polimorfismo rs12979860 de IL28B se ha identificado como “genotipo favorable” y se asocia con mayor tasa de aclaramiento espontáneo del VHC, menor gravedad de la recidiva del VHC sobre el injerto después del trasplante y mejor respuesta al tratamiento antiviral (73-76) respecto al genotipo TT.

Parámetros analíticos y tipo de recidiva histológica en el primer año postrasplante

Los niveles altos de aspartato aminotransferasa y de bilirrubina (68,77), al igual que la presencia de colestasis bioquímica en el momento de la recidiva de la hepatitis C, se correlacionan con una progresión más agresiva de la enfermedad y desarrollo más precoz de cirrosis (68,77). En un artículo publicado por Rosen *et al.* (77) se demuestra que niveles de bilirrubina mayores de 3,5 mg/dl representan un factor independiente que se asocia con mayor riesgo de desarrollo de cirrosis. También existen datos publicados que demuestran que valores de alanina aminotrasferasa mayores de 100UI/L, al año postrasplante, se asocian con un riesgo de 35% de desarrollo de cirrosis en 5 años (29).

Los hallazgos histológicos en la biopsia hepática al año postrasplante son factores que predicen el riesgo de evolución a cirrosis y por lo tanto son indicadores de la necesidad de instaurar un tratamiento antiviral precoz para abortar la historia natural de la hepatitis recurrente postrasplante. El 28-36% de los pacientes que presentan al año inflamación moderada-severa, progresan en 5 años a cirrosis, respecto a solo 0,1% de los pacientes sin inflamación o con inflamación leve (29,60). El grado de fibrosis objetivado en las biopsias al año también se asocia con mayor riesgo de desarrollo de cirrosis: 9-11% en caso de ausencia de fibrosis y de 21-27% para fibrosis F1 (29), con una mortalidad 10 veces mayor en los pacientes con fibrosis F2 ó más. (61).

Complicaciones biliares

Se ha sugerido que la estenosis de la vía biliar se asocia con una incidencia de fibrosis avanzada (78), aunque existen controversias al respecto (79). Aún así, la detección y tratamiento precoz de esta complicación son recomendables para disminuir al máximo su posible efecto perjudicial sobre el injerto.

Inmunosupresión

No existe consenso sobre la inmunosupresión óptima en pacientes VHC-positivo. Si bien ha quedado demostrado que el exceso de inmunosupresión es perjudicial, el papel individual de cada inmunosupresor no está bien definido. Se recomienda una monitorización estrecha de la inmunosupresión, sobre todo durante el postrasplante precoz, evitar triple o cuádruple terapias en dosis plenas, y los bolos de esteroides.

a. Inhibidores de calcineurina (ICN)

Hasta el momento actual, con la evidencia existente en la literatura, no se han encontrado diferencias significativas entre ciclosporina frente a tacrolimus en cuanto a la supervivencia del injerto y del paciente (80-84), y tampoco en cuanto a la progresión más agresiva de la recidiva (83,84).

b. Esteroides

Numerosos estudios han demostrado que los bolos de esteroides administrados para el tratamiento del rechazo agudo en los receptores VHC-positivo empeoran el pronóstico de la recidiva viral sobre el injerto. El tratamiento con bolos de esteroides aumenta la tasa de replicación viral, con recidiva de la enfermedad mucho más agresiva (mayor incidencia de hepatitis aguda, tiempo más corto hasta la recidiva, mayor riesgo de desarrollo de cirrosis o de hepatitis colestásica fibrosante) y mayor mortalidad precoz postrasplante (29, 85-91).

Para evitar el impacto negativo de los esteroides se han utilizado dos estrategias diferentes: pautas de inmunosupresión libres de esteroides o retirada muy rápida de los esteroides en caso de ser utilizados. En cuanto a la retirada precoz de los esteroides, la mayoría de los estudios, aunque retrospectivos pero con biopsias de protocolo, no han demostrado ningún beneficio e incluso han observado progresión más rápida a fibrosis F3-4 (85,86). Una reducción lenta y progresiva de éstos parece una estrategia más segura que la retirada rápida y precoz de los esteroides, si bien los estudios al respecto son escasos.

c. Otros inmunosupresores:

Las pautas de inmunosupresión con micofenolato de mofetilo (MMF) (92,93) o anticuerpos anti-IL2 (Ac. anti-IL2) (94,95) parecen seguras, sin impacto sobre la gravedad de la recidiva o la progresión de la fibrosis. En cuanto a los inhibidores m-Tor hay pocos estudios, todos retrospectivos, que sugieren un efecto favorable (96,97). El impacto de la azatioprina (AZT) sobre la evolución de la recidiva es controvertido (98,99).

d. Tratamiento del rechazo agudo

El número y la gravedad de los episodios de rechazo agudo (29,100) y el tratamiento del mismo con bolos de esteroides y/o OKT3 condicionan una peor evolución de la hepatitis C en el injerto. Las recomendaciones actuales en caso de rechazo en pacientes VHC-positivo son las siguientes: i) no tratar el rechazo leve, en parte debido al solapamiento entre la recidiva precoz y el rechazo leve, y en parte, por el papel negativo de los esteroides, ii) intensificar la inmunosupresión de base en los rechazos moderados y iii) aumentar la inmunosupresión de base y administrar esteroides en bolos (43). No existe consenso sobre el número de bolos de esteroides recomendables en los rechazos graves.

Monitorización de la recidiva del VHC postrasplante

Conocer la historia natural de la hepatitis C es fundamental para establecer un tratamiento óptimo dirigido a los pacientes con recidiva grave o progresión. Las biopsias hepáticas de protocolo han demostrado ser muy útiles (101), pero no están exentas de limitaciones, especialmente por error de la muestra. Recientemente, ha surgido interés por los nuevos métodos no invasivos de diagnóstico de fibrosis, tales como la elastografía de transición (fibroscan) o los modelos matemáticos (102-103). En estudios preliminares, se ha demostrado la existencia de una alta fiabilidad en la identificación de fibrosis significativa, sobre todo con la elastografía de transición. La sencillez de la prueba, además hace posible su frecuente repetición, de modo que se ha

sugerido que los cambios de elasticidad detectada durante los primeros meses son capaces de predecir con buena fiabilidad la progresión posterior de la fibrosis (103).

III. LOS RECEPTORES *TOLL-LIKE* (TLRs) EN LA INFECCIÓN POR VHC Y EN EL RECHAZO AGUDO

Características generales de los TLRs

Los TLRs son una de las principales familias de receptores conservados a lo largo de la evolución, cuya activación induce una respuesta inmune innata, promoviendo una respuesta adaptativa adecuada para la defensa del organismo (104,105). La base de esta activación es el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, tales como ácidos nucleicos de virus o componentes estructurales bacterianos (106). Posteriormente también se han identificado ligandos endógenos, o propios, que se expresan de forma inadecuada al ser liberados después de un traumatismo, daño o muerte celular y que guardan homología con los ligandos de patógenos (107,108).

En humanos se han descrito diez TLRs diferentes (TLR1-10) que se pueden clasificar fácilmente en dos subgrupos en función de su localización y patrón molecular reconocido. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10 se expresan en la membrana celular y reconocen componentes estructurales bacterianos. TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 tienen su expresión restringida a compartimentos intracelulares, principalmente en membranas endosomales, donde reconocen material genético de virus y bacterias (tabla 1) (106,109). Los TLRs están anclados a las membranas formando homodímeros, excepto TLR2 que forma heterodímeros con TLR1 y TLR6, que lo estabilizan en la membrana y fortalecen su señalización intracelular (110).

Los TLRs tienen un amplio y heterogéneo patrón de expresión celular, tanto en células implicadas en la respuesta inmune [células dendríticas, linfocitos B y T, monocitos, macrófagos y células *natural killer* (NK)], como en células no inmunes como hepatocitos, células estrelladas hepáticas, células epiteliales de los ductos biliares y células endoteliales. En conjunto, los TLRs activan cascadas de señalización intracelular que inducen la expresión de citocinas proinflamatorias, como IL6 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α (111), regulando directamente los procesos que permiten a las células dendríticas el procesamiento y presentación de antígenos para la activación del complejo

mayor de histocompatibilidad de clase II (112). Por otra parte, los TLR endosomales, además de inducir la síntesis de citocinas proinflamatorias, también activan la producción de IFNs tipo I, con una alta actividad antiviral que estimula la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (111).

El conocimiento de la funcionalidad de los TLR ha sido posible en gran medida por la gran cantidad de estudios de diferentes polimorfismos genéticos en estos receptores. Los genes que codifican para éstos contienen muchos polimorfismos de sustitución de un único nucleótido, algunos de los cuales tienen una implicación funcional importante, ya que pueden modificar la expresión y/o la función de los diferentes TLR y por tanto modificar la respuesta inmune. De hecho, algunos de ellos se han relacionado con el desarrollo de diferentes enfermedades infecciosas (bacterianas, fúngicas y víricas), autoinmunes (artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias intestinales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) o con la protección frente a la progresión de arterioesclerosis (113-121).

Tabla 1. Los TLRs y sus ligandos específicos

| TLR | Ligando | Tipo de ligando |
|--------------|--|--------------------|
| TLR1 | Lipoproteínas triacetiladas/ forma complejos con TLR2 | |
| TLR2 | Lipopolisacárido de bacterias Gram negativas, péptidoglicanos de bacterias Gram positivas y ácido lipoteicoico | Exógeno |
| | HMGB1, ácido hialurónico, proteínas de choque térmico | Endógeno |
| TLR3 | ARN de doble cadena | Exógeno y endógeno |
| TLR4 | Lipopolisacárido de bacterias Gram negativas, péptidoglicanos de bacterias Gram negativas | Exógeno |
| | Ácido hialurónico, proteínas de choque térmico, ácidos grasos libres, sulfato de heparina | Endógeno |
| TLR5 | Flagelina | Exógeno |
| TLR6 | Lipoproteínas diacetiladas/ forma complejos con TLR2 | |
| TLR7 | ARN de cadena sencilla | Exógeno y endógeno |
| TLR8 | ARN de cadena sencilla | Exógeno y endógeno |
| TLR9 | Ácido desoxirribonucleico (ADN) no-metilado | Exógeno |
| | HMGB1 | Endógeno |
| TLR10 | Desconocido | |

TLRs y la infección crónica por VHC: respuesta inmunológica, mecanismos de activación y de evasión inmune

Mecanismos de respuesta inmunológica frente al VHC

Para conseguir la eliminación del VHC y la curación de la infección, se precisa una vigorosa respuesta inmunitaria celular dirigida contra diversas estructuras de las proteínas víricas. Esta respuesta inmunitaria necesita la activación inicial de la inmunidad innata, a través de los TLRs, que actúa como motor de arranque de la respuesta adaptativa. El VHC ha desarrollado sistemas de evasión tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa, y ésta es una de las razones de la alta tasa de cronificación de la infección.

El VHC es un pequeño virus ARN de cadena sencilla positiva, que replica preferentemente en el citoplasma de los hepatocitos. La partícula viral está constituida por una nucleocápside rodeada de una membrana lipídica con 2 glucoproteínas E1 y E2 incrustadas en ella (122,123). La nucleocápside contiene el ARN viral envuelto por una membrana constituida por múltiples copias de la proteína core. La traducción del marco de lectura del genoma viral conlleva la síntesis de una poliproteína precursora, que tras ser procesada por las proteasas virales y celulares va a dar lugar a diez proteínas estructurales y no estructurales, fundamentales para la replicación y producción de nuevas partículas infectivas. Las tres proteínas estructurales (core, E1 y E2) formarán la cápside y la envoltura. Las proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) constituirán el complejo replicativo (124) (figura 2).

Las proteínas core y no-estructurales son ligandos exógenos para TLRs específicos, con la consecuente activación en cascada de la respuesta inmune innata (120) y posteriormente de la respuesta inmune adaptativa, que tarda varios días en ser operativa debido al tiempo requerido para la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B en células efectoras (112).

La activación de los linfocitos T frente al VHC es fundamental para la erradicación de la infección y para la respuesta al tratamiento (125,126). La diferenciación funcional de las subpoblaciones de los linfocitos T CD4+ colaboradores (T helper, Th) a Th1 ó a Th2 (127-129) y la activación de los linfocitos T CD8+ determinan el aclaramiento o la persistencia de la infección y

el grado de inflamación y la progresión de la enfermedad. La activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ es intensa y precoz en la infección aguda por VHC, pero es débil e ineficaz en la infección crónica, con escasa producción de citocinas a pesar de existir antígenos circulantes del VHC (130,131). Una de las claves que determinan la activación adecuada de los linfocitos T es la correcta presentación antigénica por las células dendríticas, que puede ser deficitaria en la infección crónica por el VHC (132,133). Esto, añadido a la también débil activación de las células NK, con la consiguiente producción disminuida de IFN- γ , hace que la inhibición de la replicación viral sea escasa (134-136).

Mecanismos de activación inmune frente al VHC dependientes de los TLRs

La respuesta inmune dependiente de los TLRs se inicia tras el reconocimiento de diferentes componentes del VHC por su TLR específico, según se muestra en figura 2.

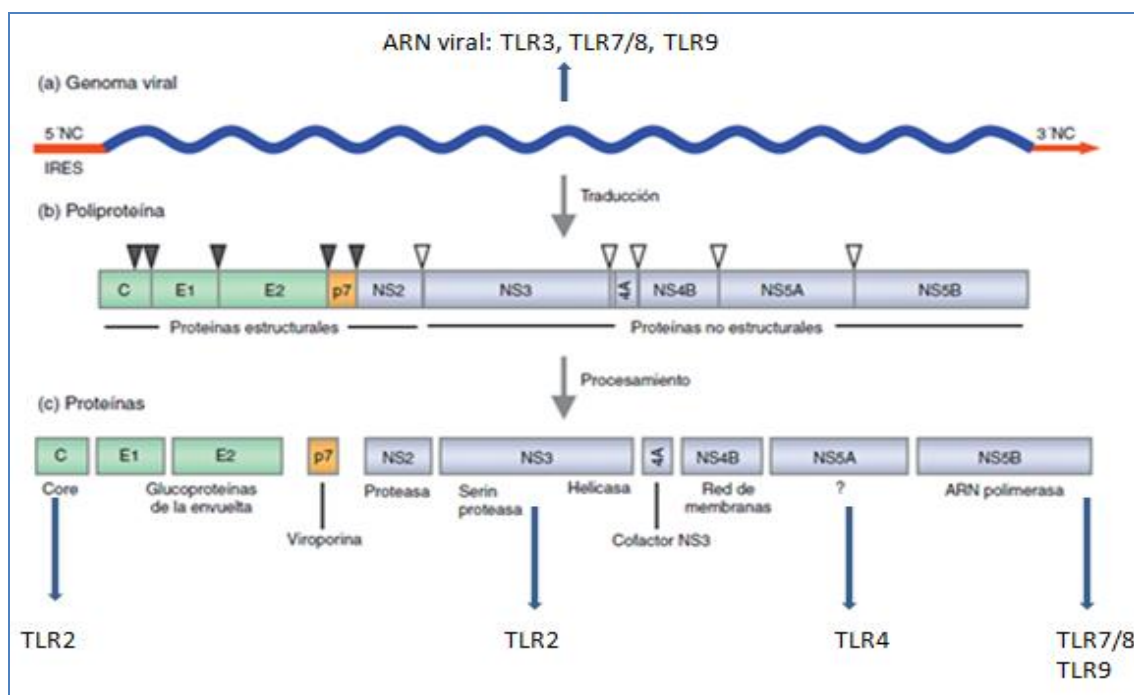


Figura 2. Esquema de la organización genómica del VHC y de las proteínas virales junto con sus TLRs específicos. a) Representación lineal del genoma viral; b) Organización de las proteínas en el precursor poliproteico; c) Proteínas virales y TLRs implicados en su reconocimiento

Las proteínas core y NS3 son ligandos de TLR2 que estimulan la activación de células inflamatorias y la inducción de la síntesis de TNF- α , IL6 e IL8 (137-138).

TLR4 reconoce la proteína NS5A, con la consecuente producción de IFN- α e IL6, sobre todo por los linfocitos B y hepatocitos. Además TLR4 induce también la síntesis de IFN- β que estimula los genes productores de IFN, tanto en las células infectadas como en las células circundantes (138-139). Por otra parte, la expresión celular de TLR2 y TLR4 aumenta en la infección crónica por el VHC, intensificando de esta forma la respuesta inmune (140-141).

El genoma viral tiene efecto directo sobre TLR3, TLR7 y TLR8, estimulando la síntesis de IFN- α y la activación de las células dendríticas plasmocitoides (142-143). La activación del TLR7 en los hepatocitos, tiene efecto antiviral independiente de los IFNs, reduciendo los niveles de ARN viral y la expresión de la proteína NS5A, fundamental para la replicación viral (144,145).

Mecanismos de evasión inmune del VHC dependientes de los TLRs

A pesar de que el VHC es capaz de activar los TLRs, también dispone de mecanismos que inhiben el funcionamiento correcto de los TLRs, lo que le permite perpetuar la infección.

La partícula viral interfiere de forma directa con la señalización mediada por TLR4 y TLR7, mientras que la proteína core del VHC disminuye la expresión de TLR4 (140,146). Las proteínas NS3 y NS3/4A inhiben la activación de las vías de señalización TLR3-dependientes, lo que disminuye la síntesis de IFN- β (147). Además, la proteína NS5A inhibe las vías de señalización de los TLR2, TLR4, TLR7 y TLR9, produciendo una síntesis deficitaria de citocinas (148). De hecho, la expresión del TLR7 en el hígado disminuye en la infección crónica, recuperándose tras alcanzar respuesta viral sostenida después de un tratamiento antiviral eficaz (149). El VHC interfiere también con TLR9, perturbando la síntesis de IFN- α e IFN- β y disminuyendo la expresión de HLA-DR en las células dendríticas plasmocitoides, disminuyendo la activación de los linfocitos T naïve (150).

Los polimorfismos de los TLRs en la infección crónica por VHC y en el trasplante hepático por cirrosis por VHC

La información publicada sobre la influencia de los polimorfismos de los TLRs en la infección crónica por VHC es escasa y contradictoria.

Los polimorfismos Thr399Gly y Asp299Gly del TLR4, que cosegregan, se han descrito en la literatura como factores protectores para la progresión de la fibrosis en pacientes con infección crónica por VHC no trasplantados (151), mientras que otros autores (152) los describen como factores de riesgo para la progresión acelerada de la enfermedad.

En cuanto al TLR3 se han analizado 2 polimorfismos frecuentes en la población caucásica, -1077T>A y Leu412Phe, sin encontrar relación con el desarrollo de la fibrosis (153).

El gen de TLR7 está localizado en el cromosoma X y se han identificado 3 polimorfismos con una incidencia superior al 5% en caucásicos: -120T>G Gln11Leu y Ala448Val (154). El polimorfismo -120T>G se ha identificado como factor protector de inflamación y fibrosis hepática en varones con infección crónica por VHC y el mecanismo protector parece estar en relación con el aumento de la síntesis de IL6 inducida por TLR7. En cambio, el polimorfismo Gln11Leu se asocia en mujeres con cargas virales altas, progresión rápida de la enfermedad y falta de respuesta al tratamiento antiviral con pautas con IFN (155).

En cuanto a los pacientes trasplantados, hay pocos trabajos sobre el papel de los polimorfismos de los TLRs en la gravedad de la recidiva de la infección por VHC después del trasplante hepático. Eid *et al.* (156) han descrito que el polimorfismo Arg753Gln de TLR2 en homocigosis, es un factor de riesgo para el desarrollo de cirrosis con pérdida del injerto y fallecimiento por el VHC, pero no encontraron ninguna asociación con los polimorfismos Arg299Gly y Thr399Ile de TLR4 y la gravedad de la recidiva del VHC. Sin embargo, otros autores encontraron que el polimorfismo Arg299Gly de TLR4 se relacionaba con una peor supervivencia del injerto (157). También hay evidencia de que la síntesis deficitaria de IFN- α en las células mononucleares en sangre periféricas y de IFN- γ en las células NK, mediada por TLR7/8, se asocia con recidiva más

agresiva de la infección postrasplante, pero sin identificarse ningún polimorfismo en concreto (158).

Papel de los TLRs en el rechazo agudo en el trasplante hepático por cirrosis por VHC

El sistema inmune del hígado está altamente especializado en prevenir la activación inmune frente al aflujo constante de patógenos que llegan a través de la circulación portal (159). En un hígado sano, la expresión y la señalización de los TLRs son bajas, sobre todo de los TLR2 y TLR4 presentes en las células Kupffer, lo que favorece la tolerancia inmune (160).

Durante el trasplante, la presencia de ligandos exógenos (traslocación de bacterias a nivel de la circulación portal o las infecciones que aparecen en el período de postrasplante inmediato) junto con la liberación de ligandos endógenos (células dañadas o muertas, traumatismo e isquemia celular) activan a TLR2 y TLR4, lo que conduce a la activación de las células dendríticas y síntesis de citocinas proinflamatorias, IFN- α e IFN- β . Las células dendríticas activadas, maduran e intensifican la presentación del aloantígeno, con estimulación mantenida de los TLR, consiguiendo de este modo aumentar la respuesta inmune mediada por los linfocitos T frente a los antígenos del donante, aumentando por tanto, el riesgo de rechazo celular agudo (108).

Existe evidencia clínica en cuanto al papel fundamental de los TLR2 y TLR4 en el rechazo agudo en receptores de trasplante hepático. La expresión de estos TLRs en los monocitos circulantes de los pacientes con rechazo agudo es mayor que en los pacientes sin rechazo agudo y disminuye después del tratamiento con esteroides (161).

Dado que TLR2 y TLR4 parecen estar implicados en el rechazo agudo, se ha investigado la posible relación de varios polimorfismos genéticos de estos receptores, con el riesgo de rechazo. Los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile del gen del TLR4 se asocian con bajo riesgo de rechazo agudo en el trasplante pulmonar (162) y renal (163), asociación no observada en el trasplante hepático (162-163). Citores *et. al* (164) han observado que el polimorfismo Leu412Phe del TLR3 podría ser un factor protector frente al

rechazo agudo en el trasplante hepático, pero en cambio los estudios realizados en trasplante renal son contradictorios (165,166).

Hipótesis

La infección crónica por el VHC es la causa más frecuente de trasplante hepático en el mundo occidental y la recidiva de la infección sobre el injerto es universal. La historia natural de la infección después del trasplante es más acelerada que en pacientes inmunocompetentes, pero sin embargo la gravedad de la recidiva es muy variable en cada individuo. Se han identificado numerosos factores de riesgo que condicionan un peor pronóstico, entre ellos factores relacionados con el propio paciente.

Los TLRs reconocen patrones moleculares compartidos por varios patógenos, entre ellos los virus, con la consecuente activación de síntesis de citocinas proinflamatorias e IFN tipo I, que inducen la respuesta inmune responsable del control de la infección por el VHC. Por lo tanto es lógico pensar que los TLRs tienen un papel fundamental en la erradicación o persistencia del virus y también en la respuesta al tratamiento antiviral. Esta asociación ha sido bien estudiada y demostrada en pacientes no trasplantados, identificándose polimorfismos genéticos de los TLRs relacionados con la gravedad de la enfermedad. En cambio, hay pocos trabajos en pacientes trasplantados que hayan investigado la influencia de los TLRs en la gravedad de la recidiva del VHC sobre el injerto hepático o en el rechazo agudo.

Basándonos en estas observaciones, se podría especular que los pacientes que desarrollan una recidiva grave de la enfermedad sobre el injerto o presentan un episodio de rechazo agudo, podrían tener una disfunción de uno o varios TLRs que podrían estar condicionados por polimorfismos genéticos en las regiones reguladoras y/o codificantes. En la práctica clínica, estos polimorfismos genéticos actuarían como marcadores genéticos sencillos de determinar para predecir de una forma precoz y no invasiva la gravedad de la recidiva o el riesgo de rechazo agudo.

Por lo tanto, la hipótesis que se plantea en este trabajo es la siguiente:

“Los polimorfismos genéticos de los TLRs influyen en la gravedad de la recidiva del VHC sobre el injerto y en el riesgo de rechazo agudo, en pacientes receptores de trasplante hepático por cirrosis por VHC”

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la influencia de los polimorfismos genéticos de los TLRs en la gravedad de la recidiva de la infección viral sobre el injerto, en pacientes con un primer trasplante hepático por cirrosis por VHC.

El objetivo secundario fue investigar la relación de los polimorfismos genéticos de los TLRs con el rechazo agudo del injerto.

Material y Métodos

I. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (Madrid) (acta número 264 del 28/03/2011).

Diseño del estudio y población estudiada

Se analizaron todos los pacientes mayores de 18 años, de ambos sexos, que recibieron un primer trasplante hepático por cirrosis por VHC (con o sin hepatocarcinoma sobreañadido), con injerto entero de donante cadáver, en el Hospital Universitario Puerta de Hierro, durante el periodo abril de 1991 hasta diciembre de 2010, con un tiempo mínimo de seguimiento postrasplante de seis meses.

Se excluyeron del estudio los pacientes con:

- trasplante combinado de otros órganos o retrasplante;
- coinfección por VIH ó VHB;
- patología vascular o biliar no resuelta al año postrasplante;
- rechazo crónico;
- viremia VHC no detectable antes del trasplante, ó
- muestra de ácido desoxirribonucleico (ADN) no disponible para el análisis de los polimorfismos genéticos.

II. VARIABLES ANALIZADAS

Datos clínicos

Los datos se recogieron retrospectivamente de las historias clínicas y del banco de datos del registro de trasplante hepático mantenido prospectivamente en la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (Madrid). Los datos recogidos fueron los siguientes:

- Datos pretrasplante del receptor: edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), genotipo del VHC, serología CMV, estadio Child-Pugh pretrasplante y la presencia de diabetes mellitus.
- Datos del donante: edad, sexo y serología del CMV, VHB y VHC.
- Datos de la cirugía: tiempo de isquemia fría.
- Datos postrasplante: bioquímica hepática, biopsia hepática, elastografía de transición, ecografía hepática, datos clínicos de cirrosis descompensada, tratamiento antiviral de la recidiva del VHC, régimen inmunosupresor inicial, presencia y tratamiento del rechazo agudo, desarrollo de enfermedad por CMV.

Definiciones de las variables analizadas

Recidiva de la infección y de la enfermedad por VHC

La recidiva de la infección por VHC postrasplante se definió mediante detección de viremia (ARN-VHC) postrasplante en sangre periférica mediante técnica de PCR.

La recidiva de la enfermedad por VHC sobre el injerto se definió mediante criterios bioquímicos (elevación de las transaminasas, bilirrubina y de las enzimas de colestasis no atribuibles a otras causas) e histológicos.

Gravedad de la recidiva

La recidiva se definió como grave cuando existieron algunas de las siguientes situaciones: a) hepatitis colestásica fibrosante confirmada histológicamente, b) fibrosis hepática igual o superior a F2, cuantificada histológicamente mediante escala METAVIR o mediante elastografía de

transición, en cualquier momento durante los dos primeros años postrasplante, ó c) desarrollo de cirrosis durante los primeros cinco años del trasplante. La cirrosis se definió por fibrosis hepática F4 mediante la escala METAVIR o en la elastografía de transición, o por criterios clínicos (ascitis, encefalopatía, varices esofágicas).

Rechazo agudo del injerto

El rechazo agudo del injerto se definió cuando existió confirmación histológica del mismo (rechazo confirmado) o cuando en la historia clínica constaba tratamiento con bolos de esteroides o cambio de inmunosupresión (rechazo clínico, no confirmado histológicamente).

Enfermedad por CMV

La enfermedad por CMV se definió por la presencia de sintomatología clínica compatible y evidencia de replicación viral mediante detección de antigenemia o viremia en sangre periférica.

III. METODOLOGIA

Recogida de muestras

La mayor parte de las muestras de ADN utilizadas proceden de colecciones de muestras de ADN, recogidas prospectivamente y retrospectivamente y preservadas a -80°C en el Servicio de Medicina Interna y en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Puerta de Hierro. A los pacientes vivos incluidos en el estudio de los que no se disponía de muestra de ADN, se les extrajo una muestra de sangre periférica, tras firmar el correspondiente consentimiento informado, para el posterior aislamiento de ADN genómico mediante el uso de productos comerciales, según las instrucciones propias del fabricante (DNA isolation kit mammalian blood, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

Todas las muestras incluidas en este estudio se encuentran en la actualidad depositadas en el Biobanco del Hospital Universitario Puerta de Hierro.

Selección y análisis de polimorfismos

Se han analizado 15 polimorfismos de sustitución de un único nucleótido (tabla 2) en todos los pacientes incluidos en el estudio. Estos polimorfismos se han seleccionado por tener una implicación fenotípica y/o por haberse encontrado asociados a diferentes enfermedades en diversas poblaciones. Todos los polimorfismos se encuentran representados en al menos un 5% de la población europea según la base de datos del *Instituto Nacional de la Salud de Norte América* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), excepto TLR2 Arg677Trp, TLR3 Asn248Ile y TLR5 Asp694Gly.

El análisis de los polimorfismos se realizó mediante PCR a tiempo real y análisis de las temperaturas de fusión en el sistema LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Para analizar cada polimorfismo, la mezcla de reacción contenía 40 ng de ADN, 1x de *genotyping Master Mix* (Roche Diagnostics) y 1 ul de una mezcla de cebadores y sondas (LightMix, TIB MOLBIOL GMBH, Berlin, Alemania) en un volumen final de 20 ul. Las condiciones de amplificación indicadas por el fabricante consistían en 10 minutos de desnaturalización a 95°C, seguidos de 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 60°C y 15

segundos a 72°C, y por último un ciclo de fusión que consistía en 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 2 minutos a 40°C y aumento gradual de temperatura hasta los 75°C. La asignación alélica de cada individuo se realizó mediante el análisis de las curvas de fusión características para cada uno de ellos.

Tabla 2. Polimorfismos analizados de los TLRs

| TLR | Cromosoma | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | rs |
|------|-----------|--------------------------|------------------------|-------------------------|
| TLR1 | 4p14 | c.743 T>C c.1805 G>T | Asp248Ser Ser602Ile | rs4833095 rs5743618 |
| TLR2 | 4q31.3 | c.2258 G>A c.2029 C>T | Arg753Gln Arg677Trp | rs5743708 rs12917864 |
| TLR3 | 4q35 | c.1234 C>T c.815 A>T | Leu412Phe Asn248Ile | rs3775291 rs5743316 |
| TLR4 | 9q32-33 | c. 896 A>G c.1196 C>T | Asp299Gly Thr399Ile | rs4986790 rs4986791 |
| TLR5 | 1q41-42 | c.1174 C>T c.2081 A>G | Arg392Ter Arg694Gly | rs5744168 rs5744176 |
| TLR6 | 4p14 | c.745 T>C | Ser249Pro | rs5743810 |
| TLR7 | Xp22.3 | c.32 A>T | Gln11Leu | rs179008 |
| TLR8 | Xp22.3 | c.1 A>G | Met1Val | rs3764880 |
| TLR9 | 3p21.3 | -1237 T>C -1486 T>C | - - | rs5743836 rs187084 |

IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias alélicas y genotípicas para cada polimorfismo se calcularon mediante conteo directo. Se comprobó que las frecuencias genotípicas eran consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de X^2 con la calculadora online “Simple Hardy-Weinberg calculator-Court lab” (Universidad de Tufts, Boston, MA) y el desequilibrio de ligamiento de los dos polimorfismos de TLR4 se calculó mediante la herramienta online Cubex Exact Solution (www.oege.org/software/cubex/).

Para el análisis univariante, las variables cualitativas se compararon mediante la prueba X^2 de Pearson para tablas de contingencia 2xN y la prueba X^2 con la corrección de continuidad de Yates para las tablas de contingencia 2x2. La fuerza de la asociación para cada variable se determinó mediante el cálculo de la odds ratio (OR) y el IC95%. Las variables cuantitativas se compararon mediante la prueba T de Student. Con las variables significativas resultantes de los análisis univariantes, se realizó un análisis multivariante mediante regresión logística.

La supervivencia actuarial de Kaplan-Meier se calculó mediante Log-Rank test.

Todos los estudios estadísticos se realizaron mediante el programa informático SPSS versión 15.0, y se consideraron significativos los valores de p menores de 0.05.

Resultados

I. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Desde abril de 1991 hasta diciembre de 2010, doscientos seis pacientes recibieron consecutivamente un primer trasplante hepático en el Hospital Universitario Puerta de Hierro por enfermedades relacionadas con el VHC. Setenta y ocho de estos 206 pacientes fueron excluidos del análisis por diferentes razones, según se muestra en la figura 3. Los ciento veintiocho pacientes restantes cumplieron los criterios de inclusión y exclusión, y fueron la población analizada.

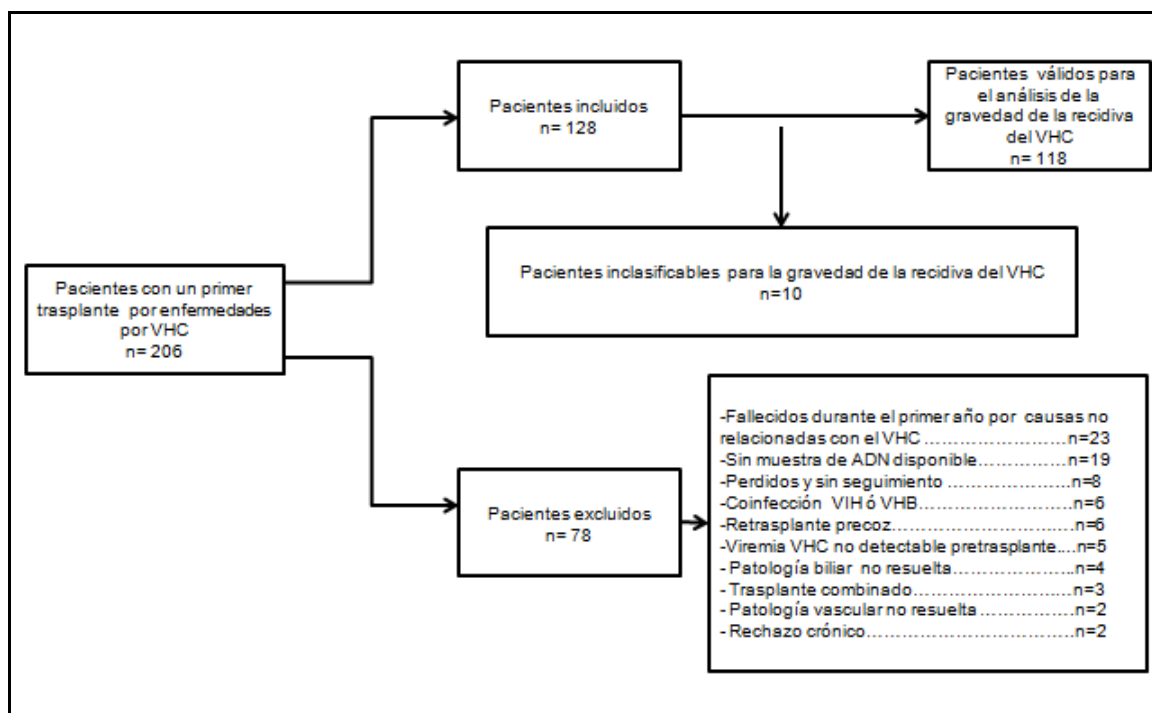


Figura 3. Diagrama de distribución de los pacientes incluidos y excluidos del análisis

Características demográficas y clínicas

Las características demográficas de los receptores, el estadio Child-Pugh, la presencia de hepatocarcinoma y de diabetes mellitus en el momento del trasplante, el genotipo del VHC, así como la edad y sexo del donante, el tiempo de isquemia fría y la incidencia de enfermedad por CMV postrasplante se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Características demográficas y datos generales de la población analizada

| Variables analizadas | Población total analizada [n(%)] n=128 | Población válida para la gravedad de la recidiva [n (%)] n=118 |
|--|---|---|
| Datos del receptor | | |
| Edad en el momento del trasplante [años (media±DE)] | 54,6±9 | 54,6±9 |
| Sexo del receptor | | |
| Mujer | 37 (28,9%) | 33 (28%) |
| Varón | 91 (71,1%) | 85 (72%) |
| IMC pretrasplante ^a [kg/m ² (media±DE)] | 25,3±3 | 25,2±3,1 |
| Estadio Child-Pugh pretrasplante | | |
| A (5-6) | 13 (10,2%) | 13 (11,0%) |
| B (7-9) | 78 (60,9%) | 70 (59,3%) |
| C (10-12) | 37 (28,9%) | 35 (29,7%) |
| Genotipo del VHC | | |
| 1a | 8 (6,3%) | 6 (5,1%) |
| 1b | 102 (79,7%) | 100 (84,7%) |
| 2, 3 ó 4 | 7 (5,4%) | 5 (4,3%) |
| Desconocido | 11 (8,6%) | 7 (5,9%) |
| Diabetes mellitus pretrasplante | 22 (17,2%) | 20 (16,9%) |
| Hepatocarcinoma pretrasplante | 48 (37,5%) | 45 (38,1%) |
| Datos del donante | | |
| Edad [años (media±DE)] | 47±17,3 | 47±17,2 |
| Sexo del donante: | | |
| Mujeres | 44 (34,4%) | 42 (35,6%) |
| Varones | 84 (65,6%) | 76 (64,4%) |
| Tiempo de isquemia fría [minutos (media±DE)] | 284,7± 117,6 | 287,9± 119,5 |
| Enfermedad por CMV | 19 (14,8%) | 18 (15,2%) |

n: número de pacientes.

^a se analizaron sólo 113 pacientes, porque en 15 se desconoce el IMC.

DE: desviación estándar.

Noventa y uno de los 128 pacientes incluidos en el análisis fueron varones (71,1%) y 37 mujeres (28,9%), con una media de edad de 54,6±9 años (rango: 31-70 años). Cincuenta y seis pacientes (43,7%) habían sido trasplantados durante el periodo comprendido entre abril de 1991 hasta diciembre de 2000, y los 72 (56,3%) restantes recibieron el trasplante durante el periodo comprendido entre enero de 2001 hasta diciembre de 2010.

En el momento del trasplante, 78 pacientes (60,9%) tenían un estadio Child-Pugh B y 48 pacientes (37,5%) tenían hepatocarcinoma confirmado histológicamente en la pieza de hepatectomía.

Los injertos procedían de donantes cadavéricos (44 mujeres y 84 varones) con una media de edad de $47 \pm 17,3$ años (rango: 14-84) y 46 (35,9%) de ellos tenían una edad igual o inferior a 40 años. Todos los pacientes presentaban compatibilidad ABO con sus donantes y la serología del VHC fue negativa en todos los donantes. La media del IMC pretrasplante del receptor en los 113 pacientes en los que se disponía de este dato, fue de $25,3 \pm 3$ kg/m² (rango: 17,6-33,7), presentando obesidad sólo nueve pacientes (6,1%). La incidencia de diabetes mellitus pretrasplante fue de 17,2% (22 pacientes). Sesenta y cuatro (50%) de los 128 pacientes recibieron después del trasplante tratamiento antiviral con doble terapia con IFN y ribavirina, alcanzando respuesta viral sostenida 26 pacientes (40,6%).

El análisis de la gravedad de la recidiva sobre el injerto de la infección viral por el VHC se realizó en 118 de los 128 pacientes. Los diez pacientes restantes fueron excluidos de este análisis por haber recibido tratamiento antiviral antes del segundo año postrasplante con recidiva no grave y alcanzar una respuesta viral sostenida (n=6), o por ausencia de datos histológicos, de elastografía de transición o de criterios clínicos de cirrosis para clasificar la gravedad de la recidiva (n=4). Las características clínicas y demográficas de este grupo fueron similares al grupo total de 128 pacientes (tabla 3).

Régimen inmunosupresor

La inmunosupresión inicial postrasplante se basó en regímenes con ciclosporina en 45 pacientes (35,1%) y en regímenes con tacrolimus en los 83 pacientes (64,9%) restantes. Tacrolimus y ciclosporina se administraron en pautas de doble o triple terapia inmunosupresora según los diferentes protocolos utilizados a lo largo del periodo de estudio (tabla 4). La proporción de pacientes según el tipo de ICN y la distribución de las diferentes pautas de inmunosupresión inicial fueron similares en el grupo de 118 pacientes válidos para el análisis de la gravedad de la recidiva viral.

Tabla 4. Distribución del régimen de inmunosupresión inicial según el tipo de ICN y según las pautas inmunosupresoras

| Régimen inmunosupresor | Población analizada [n(%)] | | | Población válida para la gravedad de la recidiva [n(%)] | | |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------|---|----------------------|--------------------|
| | Total n=128 | Ciclosporina n=45 | Tacrolimus n=83 | Total n=118 | Ciclosporina n=40 | Tacrolimus n=78 |
| ICN+esteroides | 48 (37,5%) | 8 (17,8%) | 40 (48,2%) | 44 (37,3%) | 7 (17,5%) | 37 (47,4%) |
| ICN+esteroides+ MMF | 9 (7%) | 2 (4,4%) | 7 (8,4%) | 8 (6,8%) | 2 (5%) | 6 (7,7%) |
| ICN+MMF | 3 (2,3%) | - | 3 (3,6%) | 3 (2,5%) | - | 3 (3,8%) |
| ICN+esteroides+ AZT | 27 (21,1%) | 27 (60%) | - | 23 (19,5%) | 23 (57,5%) | - |
| ICN+esteroides+ OKT3 | 6 (4,7%) | 4 (8,9%) | 2 (2,4%) | 6 (5,1%) | 4 (10%) | 2 (2,6%) |
| ICN+esteroides+ Ac. anti- IL2 | 5 (3,9%) | 3 (6,7%) | 2 (2,4%) | 5 (4,2%) | 3 (7,5%) | 2 (2,6%) |
| ICN+MMF+ Ac anti- IL2 | 30 (23,5%) | 1 (2,2%) | 29 (34,9%) | 29 (24,6%) | 1 (2,5%) | 28 (35,9%) |

Ac. Anti-IL2: anticuerpos anti-IL2, AZT: azatioprina, ICN: inhibidor de la calcineurina, MMF: micofenolato de mofetilo.

Distribución de los polimorfismos genéticos de los TLRs

Los polimorfismos genéticos de los TLRs varían según la raza y los 128 pacientes incluidos en este trabajo fueron todos individuos de raza blanca. En nuestra cohorte no se ha encontrado el alelo variante para Arg677Trp de TLR2, Asn284Ile de TLR3, Leu822Phe y Asp694Gly de TLR5, y sólo se identificaron tres pacientes heterocigotos para el polimorfismo Arg753Glu de TLR2 (frecuencia del alelo menor de 0,01). Por lo tanto no se pudo estudiar la relación de estos polimorfismos con la gravedad de la recidiva ni con el rechazo agudo sobre el injerto hepático.

Los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile de TLR4 se encuentran en desequilibrio de ligamento (coeficiente LD= 0,9). De hecho, cosegregan en todos los pacientes excepto en uno, por lo que en el análisis estadístico sólo se incluyó el polimorfismo Arg299Gly.

La distribución de los polimorfismos representados en más de un 5% de los individuos se muestra en la tabla 5. Aunque la frecuencia del alelo variante de TLR4 Arg299Gly es 0,04, también se incluyó en los estudios comparativos posteriores por tener una implicación tanto en la gravedad de la recidiva como en el rechazo agudo.

Los TLR7 y TLR8 están codificados por genes situados en el cromosoma X, por lo que en los análisis estadísticos para valorar la gravedad de la recidiva y la incidencia de rechazo agudo, sólo se han tenido en cuenta las mujeres homocigotas y los varones.

Tabla 5. Distribución de los polimorfismos genéticos de los TLRs

| TLR | Polimorfismo | FAM | Homocigoto ancestral n (%) | Heterocigoto n (%) | Homocigoto variante n (%) | HW |
|------|--------------|------|----------------------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------|
| TLR1 | Asp248Ser | 0,37 | TT: 54 (42,2%) | CT: 53 (41,4%) | CC: 21 (16,4%) | 0,2 0,31 |
| | Ser602Ile | 0,43 | GG: 45 (35,2%) | GT: 57 (44,5%) | TT: 26 (20,3%) | |
| TLR3 | Leu412Phe | 0,35 | CC: 54 (42,2%) | CT: 59 (46,1%) | TT: 15 (11,7%) | 0,85 |
| TLR4 | Asp299Gly | 0,04 | AA: 118 (92,2%) | AG: 10 (7,8%) | GG: 0 | 0,64 |
| TLR5 | Arg392Ter | 0,07 | CC: 111 (86,7%) | CT: 16 (12,5%) | TT: 1 (0,8%) | 0,62 |
| TLR6 | Ser249Pro | 0,59 | TT: 22 (17,2%) | CT: 60 (46,9%) | CC: 46 (35,9%) | 0,75 |
| TLR7 | Glu11Leu | | | | | 0,81 |
| | Mujer | 0,15 | AA: 27 (73%) | AT: 9 (24,3%) | TT: 1 (2,7%) | |
| | Varón | 0,16 | A: 76 (83,5%) | - | T: 15 (16,5%) | |
| TLR8 | Met1Val | | | | | 0,42 |
| | Mujer | 0,28 | AA: 18 (48,6%) | AG: 17 (45,9%) | GG: 2 (5,4%) | |
| | Varón | 0,27 | A: 66 (72,5%) | - | G: 25 (27,5%) | |
| TLR9 | -1237T>C | 0,11 | 102 (79,7%) | 23 (18%) | 3 (2,3%) | 0,23 0,45 |
| | -1486T>C | 0,38 | 52 (40,6%) | 56 (43,8%) | 20 (15,6%) | |

FAM: frecuencia del alelo menor, HW: equilibrio de Hardy-Weinberg.

II. RECIDIVA DEL VHC: INCIDENCIA, GRAVEDAD, FACTORES DE RIESGO Y SUPERVIVENCIA DEL INJERTO

Todos los pacientes incluidos en el estudio presentaron recidiva del VHC después del trasplante hepático. Setenta y cinco (63,6%) de los 118 pacientes analizables presentaron recidiva grave del VHC sobre el injerto. A los dos años postrasplante se pudo clasificar la gravedad de la recidiva en 105 pacientes y 54 (51,4%) fueron diagnosticados de recidiva grave. Se analizó la relación entre la gravedad de la recidiva y factores relacionados con el receptor, el donante, factores virales, factores dependientes del procedimiento quirúrgico o del régimen inmunosupresor, el tratamiento con bolos de esteroides para el rechazo agudo, los polimorfismos de los TLRs y la supervivencia del injerto.

Factores relacionados con el donante

Los pacientes que desarrollaron una recidiva grave del VHC recibieron un injerto hepático procedente de donantes con edad mayor que los pacientes que no la desarrollaron ($51,7\% \pm 16,5$ años respecto a $38,9 \pm 15,3$, $p < 0,001$). De los 76 pacientes con un injerto de un donante mayor de 40 años, 56 (73,7%) pacientes desarrollaron recidiva grave, mientras que sólo la desarrollaron 19 (45,2%) de los pacientes con un injerto de un donante con una edad igual o menor a 40 años. El riesgo de recidiva grave fue 3,39 veces mayor en el grupo de pacientes que recibieron injerto de donante mayor de 40 años ($p = 0,004$) (tabla 6).

Tabla 6. Incidencia de recidiva grave según la edad y el sexo del donante

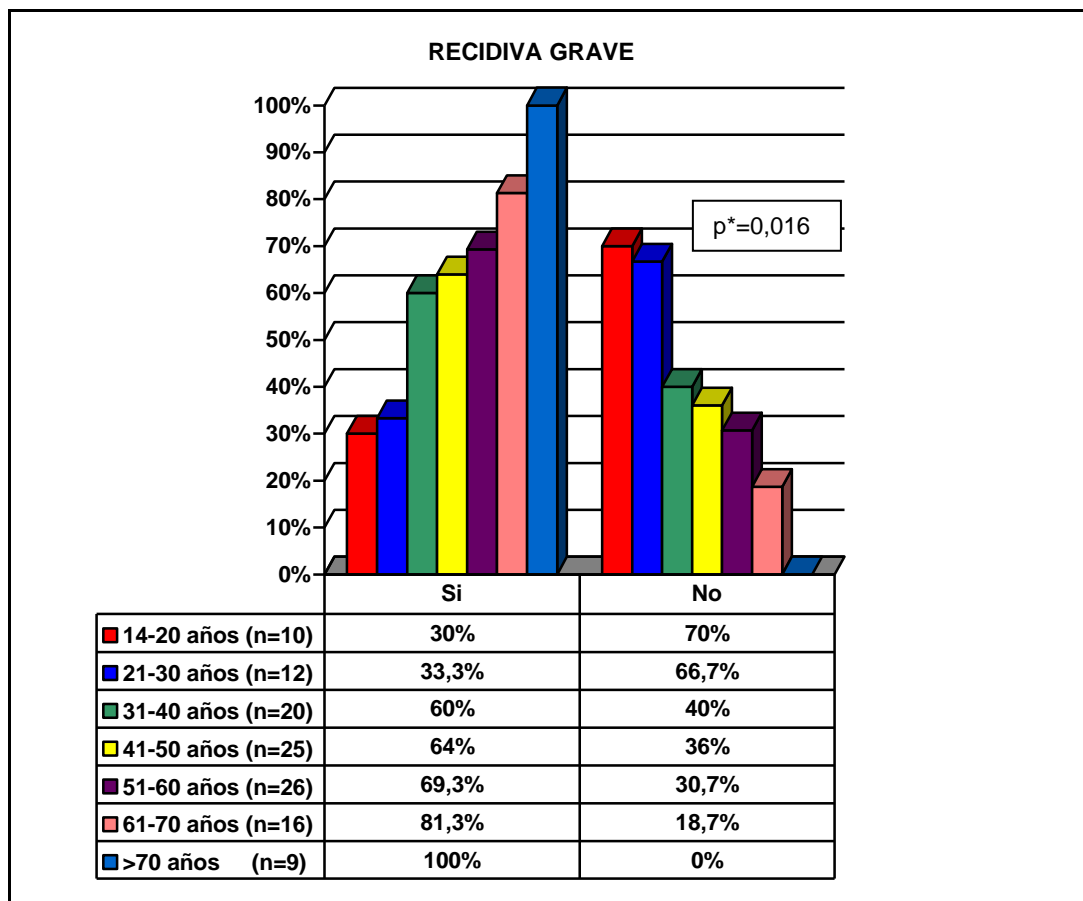
| | RECIDIVA GRAVE [n (%)] | | p* | OR (IC95%)** |
|-------------------------|------------------------|------------|-------|------------------|
| | Si (n= 75) | No (n=43) | | |
| Edad del donante | | | | |
| > 40 años | 56 (73,7%) | 20 (26,3%) | 0,004 | 3,39 (1,53-7,52) |
| ≤ 40 años | 19 (45,2%) | 23 (54,8%) | | |
| Sexo del donante | | | | |
| Mujer | 28 (66,7%) | 14 (33,3%) | 0,75 | 1,23 (0,56-2,72) |
| Hombre | 47 (61,8%) | 29 (38,2%) | | |

* p calculada mediante la prueba χ^2 con la corrección de continuidad de Yates.

**Odds ratio (intervalo de confianza del 95%).

Además, la incidencia de recidiva grave se incrementó de forma progresiva por cada década de edad del donante ($p=0,016$), según se muestra en la figura 4.

El sexo del donante en cambio, no se asoció con la gravedad de la recidiva del VHC (tabla 6).



*p calculada mediante la prueba X^2 de Pearson para tablas 2XN.

Figura 4. Incidencia de recidiva grave según la edad del donante por décadas

Tiempo de isquemia fría

La media del tiempo de isquemia fría fue similar en el grupo de los pacientes con recidiva grave que en los pacientes sin recidiva grave (tabla 7).

Tabla 7. Tiempo de isquemia fría y recidiva grave

| | RECIDIVA GRAVE (n) | | p* |
|--|--------------------|-------------|------|
| | Si (n= 75) | No (n=43) | |
| Tiempo de isquemia fría (minutos) (media±DE) | 272,9±119,2 | 312,9±116,8 | 0,08 |

* p calculada mediante la prueba T de Student.

Factores relacionados con el receptor

Ninguna de las variables pretrasplante analizadas se asoció con recidiva grave (tabla 8). Tampoco se encontró ninguna relación significativa con la presencia de hepatocarcinoma (p=0,72).

Tabla 8. Factores relacionados con el receptor

| | RECIDIVA GRAVE [n (%)] | | p* | OR (IC95%)** |
|---|------------------------|------------|-------------------|------------------|
| | Si (n= 75) | No (n=43) | | |
| Edad del receptor (años) (media±DE) | 55,3±8,4 | 53,6±10,3 | 0,32 ¹ | |
| Sexo del receptor | | | | |
| Mujer | 19 (57,6%) | 14 (42,4%) | 0,53 | 1,42 (0,62-3,23) |
| Hombre | 56 (65,9%) | 29 (34,1%) | | |
| IMC pretrasplante (kg/m²) (media±DE) | 25,2±3,2 | 25,3±2,9 | 0,92 | |
| Diabetes mellitus pretrasplante | 9 (45%) | 11 (55%) | 0,11 | 2,48 (0.93-6,57) |

* p calculada mediante la prueba X² con la corrección de continuidad de Yates, excepto ¹ calculada mediante la prueba T de Student.

**Odds ratio (intervalo de confianza del 95%).

Factores virales

No se encontró ninguna relación significativa entre la gravedad de la recidiva del VHC y el genotipo del VHC o la enfermedad por CMV después del trasplante (tabla 9).

Tabla 9. Incidencia de recidiva grave según el genotipo del VHC y la existencia o no de enfermedad por CMV

| | RECIDIVA GRAVE [n (%)] | | p* | OR (IC95%)** |
|---------------------------------------|------------------------|------------|------|------------------|
| | Si | No | | |
| Genotipo del VHC^a | | | | |
| 1 | 66 (62,3%) | 40 (37,7%) | 1 | 1,1 (0,18-6,87) |
| Otro | 3 (60%) | 2 (40%) | | |
| Enfermedad por CMV^b | | | | |
| Si | 13 (72,2%) | 5 (27,8%) | 0,59 | 1,58 (0,52-4,78) |
| No | 61 (62,2%) | 37 (37,8%) | | |

* p calculada mediante la prueba χ^2 con la corrección de continuidad de Yates.

**Odds ratio (intervalo de confianza del 95%).

^a se analizaron sólo 111 pacientes, porque en 7 se desconoce el genotipo del VHC.

^b se analizaron sólo 116 pacientes, porque en 2 no hay datos sobre la enfermedad por CMV.

Complicaciones biliares y vasculares

La incidencia global de complicaciones biliares durante los primeros 12 meses después del trasplante fue 22,6%. No hubo diferencias en la incidencia de recidiva grave entre los pacientes con complicaciones biliares (58,3%) respecto a los pacientes sin complicaciones biliares (64,6%, $p=0,75$).

La incidencia global de las complicaciones vasculares resueltas en el primer año postrasplante fue de 12,3%. No se encontró ninguna diferencia entre la incidencia de recidiva grave en los pacientes con complicaciones vasculares (84,6%) respecto a los pacientes sin esta complicación (60,2%, $p=0,16$).

Factores relacionados con la inmunosupresión

Se compararon las pautas de inmunosupresión de inicio, según el tipo de ICN empleado. Presentaron recidiva grave 71,8% de los pacientes tratados con tacrolimus frente a 47,5% de los pacientes tratados con ciclosporina ($p=0,017$) (tabla 10).

Tabla 10. Incidencia de recidiva grave según el tipo de inhibidor de calcineurina (ICN) utilizado en la inmunosupresión inicial

| | RECIDIVA GRAVE [n (%)] | | p* | OR (IC95%)** |
|------------------------------|------------------------|------------|-------|------------------|
| | Si (n=75) | No (n=43) | | |
| Tipo de ICN de inicio | | | | |
| Tacrolimus | 56 (71,8%) | 22 (28,2%) | 0,017 | 2,82 (1,27-6,21) |
| Ciclosporina | 19 (47,5%) | 21 (52,5%) | | |

* p calculada mediante la prueba χ^2 con la corrección de continuidad de Yates.

**Odds ratio (intervalo de confianza del 95%).

Tampoco se encontraron diferencias en la incidencia de la recidiva grave al comparar los pacientes que recibieron bolos de esteroides por rechazo agudo frente a los que no precisaron bolos de esteroides (tabla 11).

Tabla 11. Incidencia de recidiva grave según el rechazo agudo tratado con bolos de esteroides

| | RECIDIVA GRAVE [n (%)] | | p* | OR (IC95%)** |
|--|------------------------|------------|-------|------------------|
| | Si (n=75) | No (n=43) | | |
| Rechazo agudo tratado con bolos de esteroides | | | | |
| Si | 14 (48,3%) | 15 (51,7%) | 0,081 | 2,33 (0,99-5,49) |
| No | 61 (68,5%) | 28 (31,5%) | | |

* p calculada mediante la prueba χ^2 con la corrección de continuidad de Yates.

**Odds ratio (intervalo de confianza del 95%).

Polimorfismos genéticos de los TLRs

Las distribuciones genotípicas de los polimorfismos de los TLRs según la gravedad de la recidiva en los 118 pacientes estudiados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Distribución de los polimorfismos de los TLRs según la gravedad de la recidiva

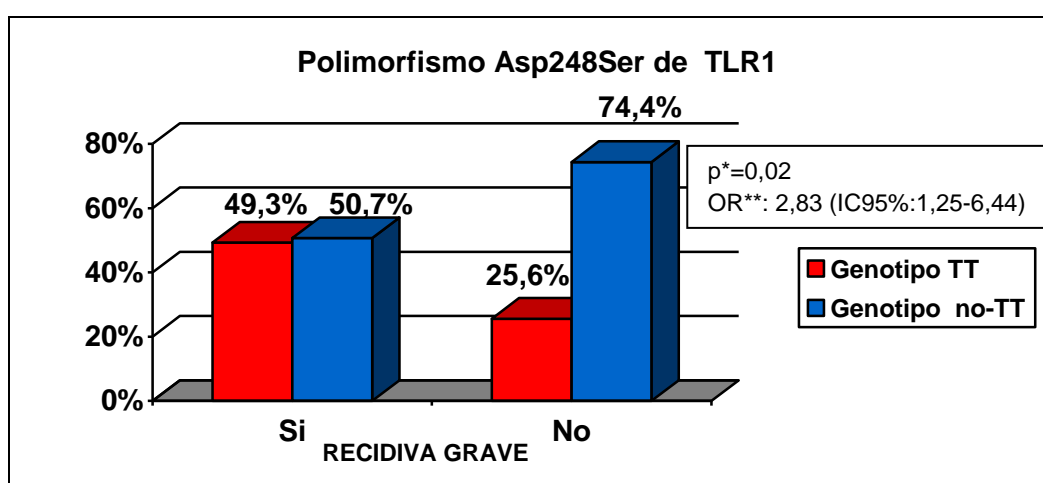
| TLR | POLIMORFISMO | GENOTIPOS | RECIDIVA GRAVE [n (%)] | | p* |
|--------|--------------|-----------|------------------------|------------|----------------------|
| | | | Si (n=75) | No (n=43) | |
| TLR1 | Asp248Ser | CC | 11 (14,7%) | 9 (20,9%) | p=0,04 |
| | | CT | 27 (36%) | 23 (53,5%) | |
| | | TT | 37 (49,3%) | 11 (25,6%) | |
| | Ser602Ile | GG | 29 (38,7%) | 11 (25,6%) | p=0,32 |
| | | GT | 31 (41,3%) | 23 (53,5%) | |
| | | TT | 15 (20%) | 9 (20,9%) | |
| TLR3 | Leu412Phe | CC | 36 (48%) | 16 (37,2%) | p=0,44 |
| | | CT | 31 (41,3%) | 23 (53,3%) | |
| | | TT | 8 (10,7%) | 4 (9,3%) | |
| TLR4 | Asp299Gly | AA | 72 (96%) | 38 (88,4%) | p ¹ =0,23 |
| | | AG | 3 (4%) | 5 (11,6%) | |
| TLR5 | Arg392Ter | CC | 66 (88%) | 36 (83,7%) | p=0,52 |
| | | CT | 8 (10,7%) | 7 (16,3%) | |
| | | TT | 1 (1,3%) | 0 | |
| TLR6 | Ser249Pro | CC | 27 (36%) | 15 (34,9%) | p=0,44 |
| | | CT | 33 (44%) | 23 (53,5%) | |
| | | TT | 15 (20%) | 5 (11,6%) | |
| TLR7** | Glu11Leu | AA ó A | 62 (87,3%) | 32 (84,2%) | p ¹ =0,87 |
| | | TT ó T | 9 (12,7%) | 6 (15,8%) | |
| TLR8** | Met1Val | AA ó A | 47 (72,3%) | 29 (78,4%) | p ¹ =0,66 |
| | | GG ó G | 18 (27,7%) | 8 (21,6%) | |
| TLR9 | -1237T>C | CC | 3 (4%) | 0 | p=0,23 |
| | | CT | 16 (21,3%) | 6 (14%) | |
| | | TT | 56 (74,7%) | 37 (86%) | |
| | -1486T>C | CC | 10 (13,3%) | 9 (20,9%) | p=0,05 |
| | | CT | 29 (38,7%) | 23 (53,5%) | |
| | | TT | 36 (48%) | 11 (25,6%) | |

*p calculada mediante la prueba χ^2 de Pearson para tablas 3X2 excepto ¹calculada mediante la prueba χ^2 con la corrección de continuidad de Yates.

**Sólo se analizaron las mujeres homocigotas y los varones (n= 109 para TLR7 y n=102 para TLR8).

De todos los polimorfismos analizados en la gravedad de la recidiva viral, sólo se observaron diferencias significativas en la distribución de los polimorfismo Asp248Ser de TLR1 ($p=0,04$) y -1486T>C de TLR9 ($p=0,05$).

Comparando el genotipo TT frente a los genotipos no-TT (CC y CT) del polimorfismo Asp248Ser de TLR1, se observó que el genotipo TT está presente en 37 (49,3%) de los pacientes con recidiva grave y en 11 (25,6%) de los pacientes sin recidiva grave ($p=0,02$). Así mismo, el riesgo de recidiva grave fue 2,83 veces mayor en los pacientes con genotipo TT que en los pacientes con genotipos no-TT (OR: 2,83; IC95%:1,25- 6,44) (figura 5).

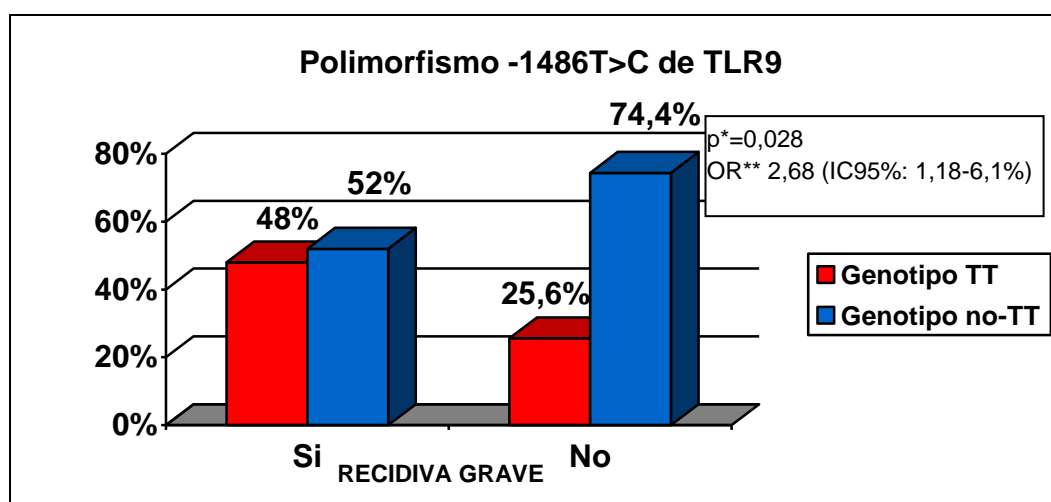


* p calculada mediante la prueba χ^2 con la corrección de continuidad de Yates.

**Odds ratio (intervalo de confianza del 95%).

Figura 5. Distribución de los genotipos del polimorfismo Asp248Ser de TLR1 según la gravedad de la recidiva

En cuanto al polimorfismo -1486T>C de TLR9 también se observó que una mayor proporción de pacientes con recidiva grave tenía el genotipo ancestral TT respecto a los pacientes sin recidiva grave (48% frente a 25,6%, $p=0,028$). El riesgo de recidiva grave relacionado con este polimorfismo fue 2,68 veces mayor en los pacientes con genotipo TT frente a los genotipos no TT (IC95% 1,18- 6,1) (figura 6).



* p calculada mediante la prueba χ^2 con la corrección de continuidad de Yates.

**Odds ratio (intervalo de confianza del 95%).

Figura 6. Distribución de genotipos del polimorfismo -1486T>C de TLR9 según la gravedad de la recidiva

En resumen, en el análisis univariante los factores de riesgo de recidiva grave del VHC después del trasplante fueron la edad del donante mayor de 40 años, las pautas de inmunosupresión basadas en tacrolimus respecto a ciclosporina, el genotipo TT de polimorfismo Asp248Ser de TLR1 y el genotipo TT de polimorfismo -1486T>C de TLR9 (tabla 13)

Tabla 13. Factores de riesgo de recidiva grave del VHC en el análisis univariante

| Variable | p* | OR** (IC95%) |
|--|-------|------------------|
| Edad del donante > 40 años | 0,004 | 3,39 (1,53-7,52) |
| Inmunosupresión con tacrolimus | 0,017 | 2,82 (1,27-6,21) |
| Genotipo TT del polimorfismo Asp248Ser de TLR1 | 0,02 | 2,83 (1,25-6,44) |
| Genotipo TT del polimorfismo -1486T>C de TLR9 | 0,028 | 2,68 (1,18-6,10) |

* p calculada mediante la prueba χ^2 con la corrección continuada de Yates

**Odds ratio (intervalo de confianza del 95%)

Factores de riesgo de recidiva grave del VHC en el análisis multivariante

La edad del donante, el genotipo TT del polimorfismo Asp248Ser de TLR1 y genotipo TT del polimorfismo -1486T>C de TLR9 fueron factores de riesgo independientes para la recidiva grave del VHC en el análisis multivariante, mientras que la inmunosupresión con tacrolimus perdió la significación estadística (tabla 14).

Tabla 14. Factores de riesgo de recidiva grave del VHC en el análisis multivariante

| Variable | p | OR* (IC95%) |
|---|-------|-------------------|
| Edad del donante > 40 años | 0,028 | 2,70 (1,11- 6,58) |
| Inmunosupresión con tacrolimus | 0,122 | 2,03 (0,83-4,97) |
| Genotipo TT del polimorfismo Asp248Ser de TLR 1 | 0,01 | 3,28 (1,32-8,12) |
| Genotipo TT del polimorfismo -1486 de TLR9 | 0,036 | 2,65 (1,06-6,6) |

*Odds ratio (intervalo de confianza del 95%)

Al ser factores de riesgo independientes, se analizó si la asociación de estas variables incrementa el riesgo de recidiva grave y se observó que la presencia de uno de los dos genotipos TT de riesgo, de los dos juntos ó de los dos juntos más una edad del donante mayor de 40 años incrementa de forma progresiva y significativa el riesgo de recidiva grave (tabla 15).

Tabla 15. Efecto aditivo de los factores de riesgo de recidiva grave

| Variable | p* | OR**(IC95%) |
|---|--------------------|--------------------|
| Uno de los dos genotipos TT ^a | 0,001 | 3,9 (1,75- 8,79) |
| Ambos genotipos TT ^a | 0,044 | 5,12 (1,11- 23,61) |
| Ambos genotipos TT ^a y edad del donante >40 años | 0,033 ¹ | 8,8 (1,11-69,88) |

*p calculada mediante la prueba χ^2 con la corrección de continuidad de Yates, excepto ¹calculada mediante la prueba χ^2 de Pearson para tablas 3X2

**Odds ratio (intervalo de confianza del 95%)

^a Genotipos del polimorfismo Asp248Ser de TLR1 o -1486T>C de TLR9

Supervivencia del injerto

El tiempo medio de seguimiento postrasplante fue $99,9 \pm 61,2$ meses.

La supervivencia actuarial del injerto a uno, cinco, diez y veinte años fue, respectivamente, del 96,8%, 82,5%, 62,6% y 23% (figura 7).

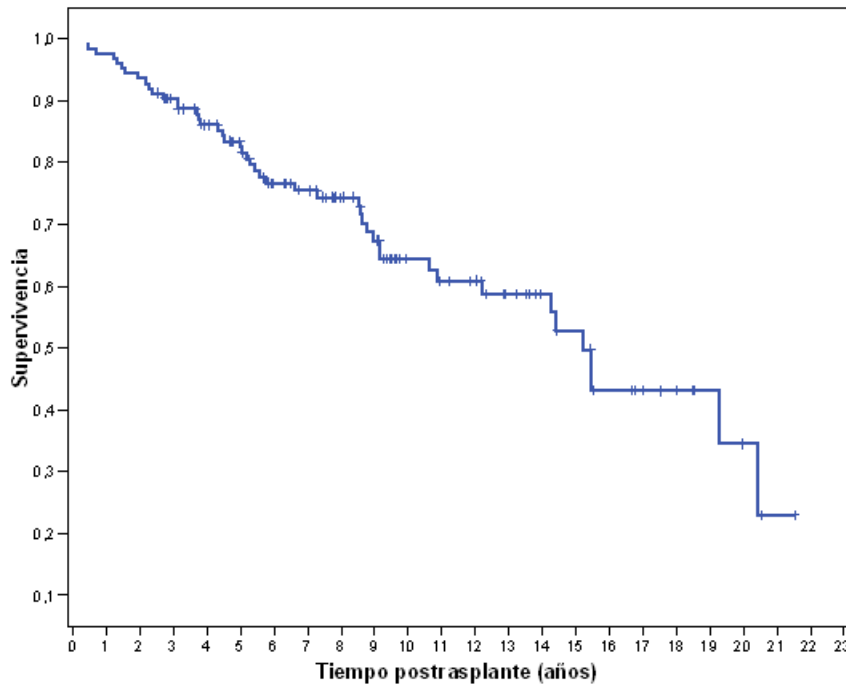


Figura 7. Supervivencia actuarial del injerto

Supervivencia del injerto según la gravedad de la recidiva

La supervivencia del injerto en los pacientes con recidiva grave por VHC fue significativamente menor que la de los pacientes sin recidiva grave (figura 8). La supervivencia a uno, cinco y diez años de los pacientes con recidiva grave fue 94,5%, 72% y 48,4% respectivamente, frente a 100%, 100% y 96,7% en los pacientes sin recidiva grave ($p < 0,001$).

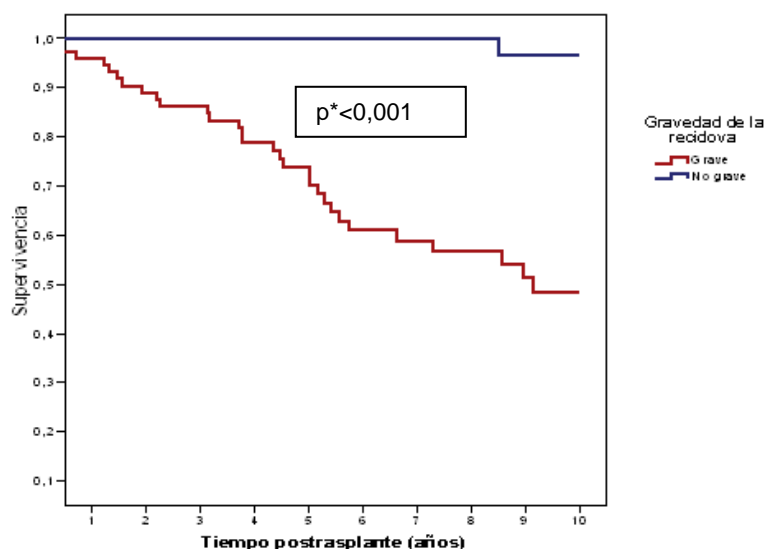
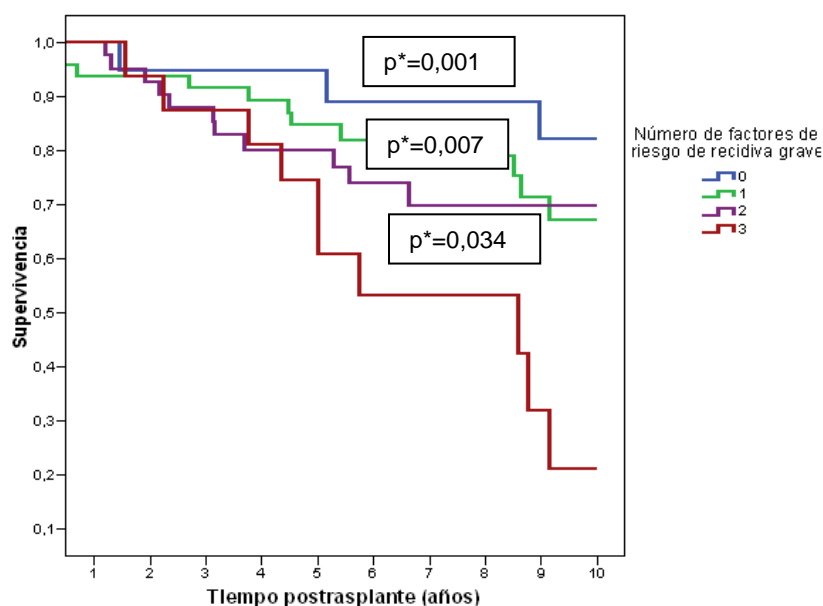


Figura 8. Supervivencia del injerto según la gravedad de la recidiva

Supervivencia según los factores de riesgo de recidiva grave

La presencia de uno, dos o tres factores de riesgo de recidiva grave, influyó en la supervivencia del injerto. La supervivencia a los cinco y a los diez años fue de 89,2% y 82,3% en ausencia de factores de riesgo, de 84,7% y 67,3% en caso de existir un factor de riesgo, de 80,1% y 69,9% en caso de existir dos factores de riesgo y de 60,9% y 21,3% en caso existir tres factores de riesgo (figura 9).

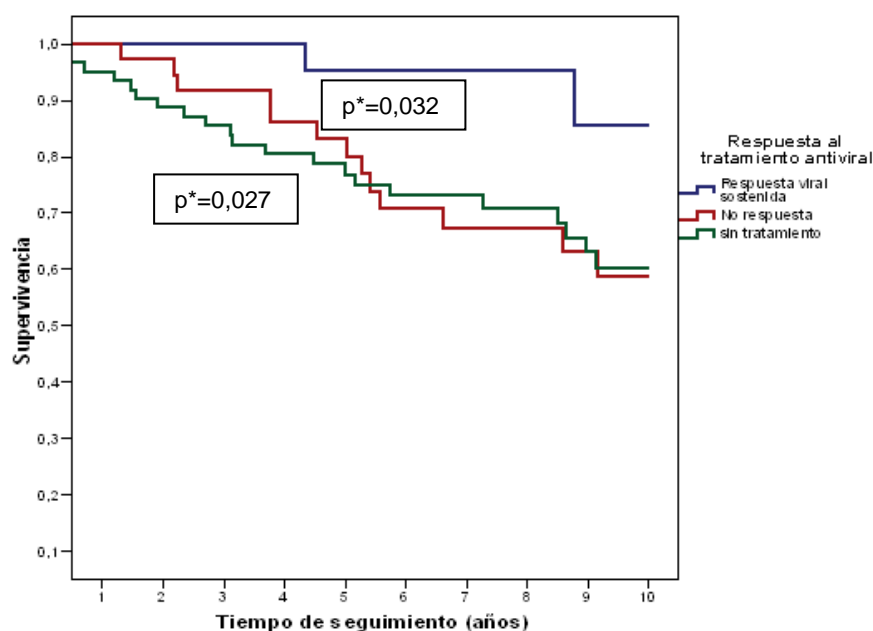


*p al comparar la presencia de 3 factores de riesgo frente a 0, 1 ó 2 factores respectivamente

Figura 9. Supervivencia del injerto según el número de factores de riesgo de recidiva grave

Supervivencia del injerto según el tratamiento antiviral

Se analizó el impacto del tratamiento antiviral y la respuesta al tratamiento sobre la supervivencia del injerto. La supervivencia de los pacientes no tratados o sin respuesta al tratamiento fue significativamente menor respecto a los pacientes con respuesta viral sostenida (figura 10). La supervivencia a los 5 y a los 10 años fue, respectivamente, de 95,2% y 85,7% en los pacientes con respuesta viral sostenida, de 80,1% y 58,7% en los pacientes sin respuesta viral sostenida y 76,9 % y 60,3 % en los pacientes no tratados. La supervivencia acumulada de los pacientes que no alcanzaron respuesta viral sostenida fue similar a la de los pacientes que no recibieron tratamiento antiviral.



*p al comparar la supervivencia de los pacientes con respuesta viral sostenida con los pacientes sin respuesta viral sostenida o no tratados

Figura 10. Supervivencia según el tratamiento antiviral y la respuesta al finalizar el mismo

III. RECHAZO AGUDO: INCIDENCIA Y FACTORES DE RIESGO

Treinta y nueve (30,5%) de los 128 pacientes analizados presentaron rechazo agudo del injerto durante los primeros 6 meses del trasplante, precisando tratamiento con bolos de esteroides 33 pacientes. En 14 de los 39 pacientes el rechazo fue confirmado histológicamente y en los 25 restantes el diagnóstico del rechazo fue clínico. La incidencia del rechazo agudo en el primer mes fue de 84,6% en el grupo de pacientes con confirmación histológica y de 94,4% en el grupo de pacientes sin confirmación histológica.

Factores relacionados con el receptor

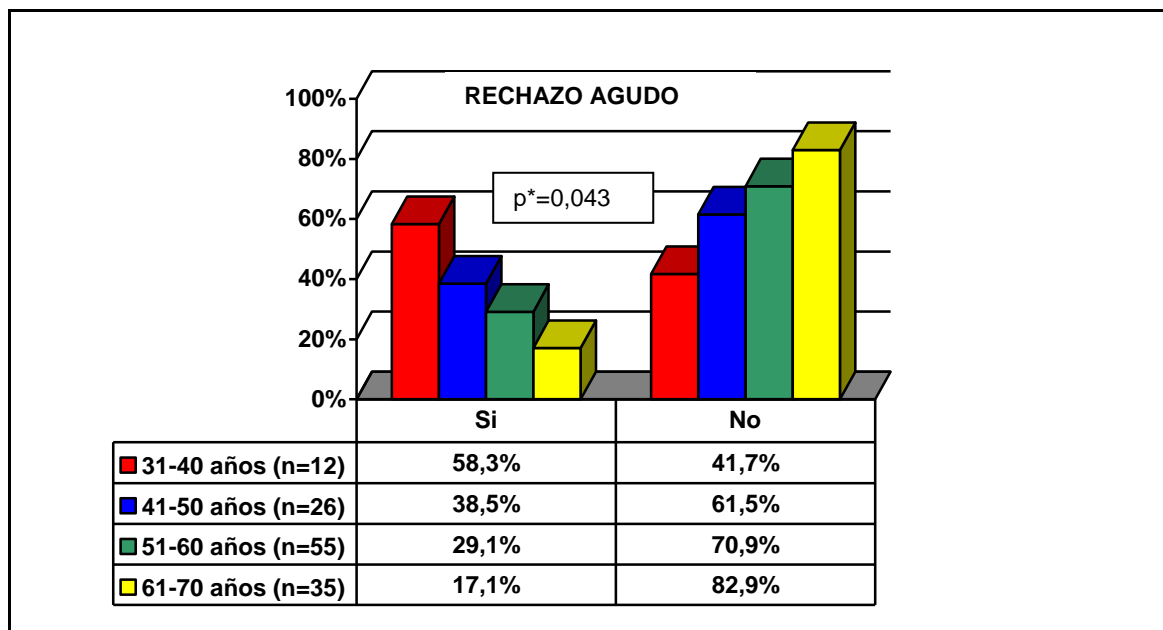
Los pacientes que desarrollaron rechazo eran más jóvenes ($51,4 \pm 9$ años) que los pacientes sin rechazo agudo ($56 \pm 8,7$ años, $p=0,006$) (tabla 16). A raíz de este hallazgo se analizó la incidencia del rechazo según la edad del receptor, escogiendo como punto de corte los 50 años. Se observó que la incidencia del rechazo agudo fue de 45,9 % en los pacientes con edad inferior o igual a 50 años respecto a 24,1 % en los pacientes con más de 50 años ($p=0,027$) (tabla 16).

Tabla 16. Incidencia del rechazo según la edad del receptor

| | RECHAZO AGUDO [n(%)] | | p* | OR (IC95%)** |
|---|----------------------|--------------|-------|-------------------|
| | Si (n=39) | No (n=89) | | |
| Edad del receptor (años) (media \pm DE) | 51,4 \pm 9 | 56 \pm 8,7 | 0,006 | |
| Edad del receptor | | | | |
| ≤ 50 años | 17 (45,9%) | 20 (54,1%) | 0,027 | 2,67 (1,19- 5,96) |
| >50 años | 22 (24,2%) | 69 (75,8%) | | |

* p calculada mediante la prueba X^2 con la corrección de continuidad de Yates, excepto ¹ calculada mediante la prueba T de Student

Además la incidencia del rechazo agudo disminuyó progresivamente por cada década de edad del receptor ($p=0,043$) (figura 11).



* p calculada mediante la prueba χ^2 de Pearson para tablas 2XN

Figura 11. Incidencia del rechazo agudo por décadas de edad del receptor

El sexo del receptor, la presencia de diabetes mellitus pretrasplante o el grado de obesidad pretrasplante no se asociaron con el riesgo de rechazo agudo (tabla 17).

Tabla 17. Incidencia del rechazo según sexo, IMC y DM pretrasplante

| | RECHAZO AGUDO [n (%)] | | p* | OR (IC95%)** |
|---|-----------------------|------------|-------------------|-------------------|
| | Si (n=39) | No (n=89) | | |
| Sexo del receptor | | | | |
| Mujer | 9 (24,3%) | 28 (75,7%) | 0,45 | 0,65 (1,56- 2,74) |
| Varón | 30 (33%) | 61 (67%) | | |
| Clasificación según el IMC^a | | | | |
| - Normal < 25 kg/m ² | 15 (25,4%) | 44 (74,6%) | 0,13 ¹ | |
| - Sobrepeso: 25-29,9 kg/m ² | 17 (37,8%) | 28 (62,2%) | | |
| - Obesidad ≥ 30 kg/m ² | 5 (55,6%) | 4 (44,4%) | | |
| Diabetes mellitus pretrasplante | 10 (45,5%) | 12 (54,5%) | 0,12 | 2,38 (0,92-6,12) |

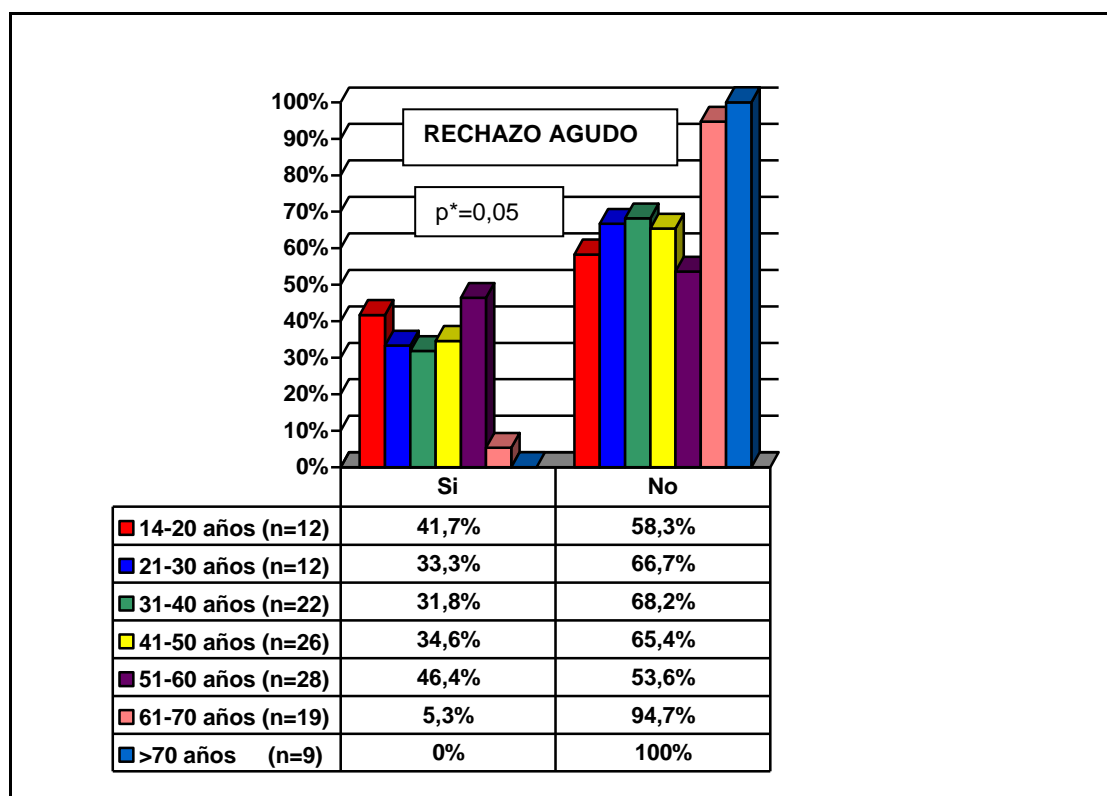
*p calculada mediante la prueba χ^2 con la corrección de continuidad de Yates, excepto ¹ calculada mediante la prueba χ^2 de Pearson para tablas 3X2.

**Odds ratio (intervalo de confianza del 95%).

^a número de pacientes de 113, porque en 5 se desconoce el IMC.

Factores relacionados con el donante

La media de edad de los donantes fue menor en el grupo de pacientes con rechazo ($42,7 \pm 14,4$ años) que en el resto ($48,9 \pm 18,2$ años, $p=0,035$). La incidencia del rechazo disminuyó de forma significativa a partir de la década de los 61-70 años del donante, como se muestra en la figura 12 ($p=0,05$).



*p calculada mediante la prueba χ^2 de Pearson para tablas 2XN.

Figura 12. Incidencia del rechazo agudo por décadas de edad del donante

La edad del donante inferior o igual a los 60 años se asoció con un riesgo de rechazo 16,5 veces mayor (IC95%: 2,19-126,8) (tabla 18).

Dado que la edad del donante inferior o igual a 60 años y la del receptor edad menor o igual a 50 años son factores de riesgo para el rechazo agudo, se evaluó si la suma de la edad del receptor y del donante menor o igual a 110 años, también se asocia con mayor riesgo de rechazo agudo. La incidencia del rechazo agudo fue de 39% en los pacientes con la suma de edad del donante y del receptor menor o igual a 110 años, frente a solo 15,2% en los pacientes en los que esta suma fue mayor a 110 años (tabla 18).

No se encontraron diferencias en cuanto al sexo del donante y la incidencia del rechazo (tabla 18).

Tabla 18. Incidencia de rechazo agudo del injerto según sexo del donante, edad del donante o suma de edad del donante y receptor

| | RECHAZO AGUDO [n (%)] | | p* | OR (IC95%)** |
|-------------------------------------|-----------------------|------------|-------|-------------------|
| | Si (n=39) | No (n=89) | | |
| Edad del donante | | | | |
| ≤ 60 años | 38 (38%) | 62 (62%) | 0,001 | 16,5 (2,16-126,8) |
| > 60 años | 1 (3,6%) | 27 (96,4%) | | |
| Sexo del donante | | | | |
| Mujer | 12 (27,3%) | 32 (72,7%) | 0,71 | 0,79 (0,35-1,77) |
| Varón | 27 (32,1%) | 57 (67,9%) | | |
| Suma edad donante y receptor | | | | |
| ≤ 110 años | 32 (39%) | 50 (61%) | 0,009 | 3,57 (1,42-8,94) |
| >110 años | 7 (15,2%) | 39 (84,8%) | | |

* p calculada mediante la prueba χ^2 con la corrección de continuidad de Yates.

**Odds ratio (intervalo de confianza del 95%).

Tiempo de isquemia fría

No hubo diferencia significativa en el tiempo de isquemia fría entre el grupo de pacientes con rechazo y sin rechazo (tabla 19).

Tabla 19. Tiempo de isquemia fría y el rechazo agudo

| | RECHAZO AGUDO (n) | | p* |
|--|-------------------|-------------|------|
| | Si (n= 75) | No (n=43) | |
| Tiempo de isquemia fría (minutos) (media±DE) | 298,8±112 | 278,2±120,1 | 0,37 |

* p calculada mediante la prueba T de Student.

Factores relacionados con la inmunosupresión

Presentaron rechazo agudo 18,1% de los pacientes que recibieron inmunosupresión inicial con tacrolimus y 53,3% de los pacientes que recibieron ciclosporina ($p < 0,001$) (tabla 20).

Tabla 20. Incidencia del rechazo agudo según pauta de inmunosupresión de inicio

| | RECHAZO AGUDO [n (%)] | | p* | OR (IC95%)** |
|------------------------------|-----------------------|------------|--------|-------------------|
| | Si (n=39) | No (n=89) | | |
| Tipo de ICN de inicio | | | | |
| Tacrolimus | 15 (18,1%) | 68 (81,9%) | <0,001 | 5,18 (2,31-11,64) |
| Ciclosporina | 24 (53,3%) | 21 (46,7%) | | |

* p calculada mediante la prueba χ^2 con la corrección de continuidad de Yates

**Odds ratio (intervalo de confianza del 95%)

Polimorfismos genéticos de los TLRs

La distribución genotípica de los polimorfismos analizados según el rechazo agudo se muestra en la tabla 21.

Tabla 21. Distribución de los polimorfismos de los TLRs según el rechazo agudo

| TLR | POLIMORFISMO | GENOTIPOS | RECHAZO AGUDO [n (%)] | | p * |
|--------|--------------|-----------|-----------------------|------------|----------------------|
| | | | Si (n=39) | No (n=89) | |
| TLR1 | Asp248Ser | CC | 9 (23,1%) | 12 (13,5%) | p=0,38 |
| | | CT | 14 (35,9%) | 39 (43,8%) | |
| | | TT | 16 (41%) | 38 (42,7%) | |
| | Ser602Ile | GG | 16 (41%) | 29 (32,6%) | p=0,43 |
| | | GT | 14 (35,9%) | 43 (48,3%) | |
| | | TT | 9 (23,1%) | 17 (19,1%) | |
| TLR3 | Leu412Phe | CC | 19 (48,7%) | 35 (39,3%) | p=0,61 |
| | | CT | 16 (41%) | 43 (48,3%) | |
| | | TT | 4 (10,3%) | 11 (12,4%) | |
| TLR4 | Asp299Gly | AA | 36 (92,3%) | 82 (92,1%) | p [†] =1 |
| | | AG | 3 (7,7%) | 7 (7,9%) | |
| TLR5 | Arg392Ter | CC | 33 (84,6%) | 78 (87,6%) | p=0,66 |
| | | CT | 6 (15,4%) | 10 (11,2%) | |
| | | TT | 0 | 1 (1,1%) | |
| TLR6 | Ser249Pro | CC | 16 (41%) | 30 (33,7%) | p=0,45 |
| | | CT | 15 (38,5%) | 45 (50,6%) | |
| | | TT | 8 (20,5%) | 14 (15,7%) | |
| TLR7** | Glu11Leu | AA ó A | 32 (86,5%) | 71 (86,6%) | p [†] =1 |
| | | TT ó T | 5 (13,5%) | 11 (13,4%) | |
| TLR8** | Met1Val | AA ó A | 34 (91,9%) | 50 (67,6%) | p [†] =0,01 |
| | | GG ó G | 3 (8,1%) | 24 (32,4%) | |
| TLR9 | -1237T>C | CC | 1 (2,6%) | 2 (2,2%) | p=0,87 |
| | | CT | 8 (20,5%) | 15 (16,9%) | |
| | | TT | 30 (76,9%) | 72 (80,9%) | |
| | -1486T>C | CC | 6 (15,4%) | 14 (15,7%) | p=0,1 |
| | | CT | 17 (43,6%) | 39 (43,8%) | |
| | | TT | 16 (41%) | 36 (40,4%) | |

*p calculada mediante la prueba χ^2 de Pearson para tablas 3X2, excepto [†]calculada mediante la prueba χ^2 con la corrección de continuidad de Yates.

**Sólo se analizaron las mujeres homocigotas y los varones (n= 119 para TLR7 y n=112 para TLR8).

El único polimorfismo que alcanzó significación estadística fue el polimorfismo Met1Val de TLR8. El genotipo ancestral, AA en mujeres y A en varones, están presentes en el 91,9% de los pacientes con rechazo agudo y sólo en 67,6% de los que no tienen rechazo (p=0,01). Las mujeres con

genotipo AA y los varones con genotipo A tuvieron un riesgo de rechazo 5,43 veces superior a las mujeres y varones con genotipo GG y genotipo G respectivamente (IC95%: 1,52-19,61%)(figura 13).

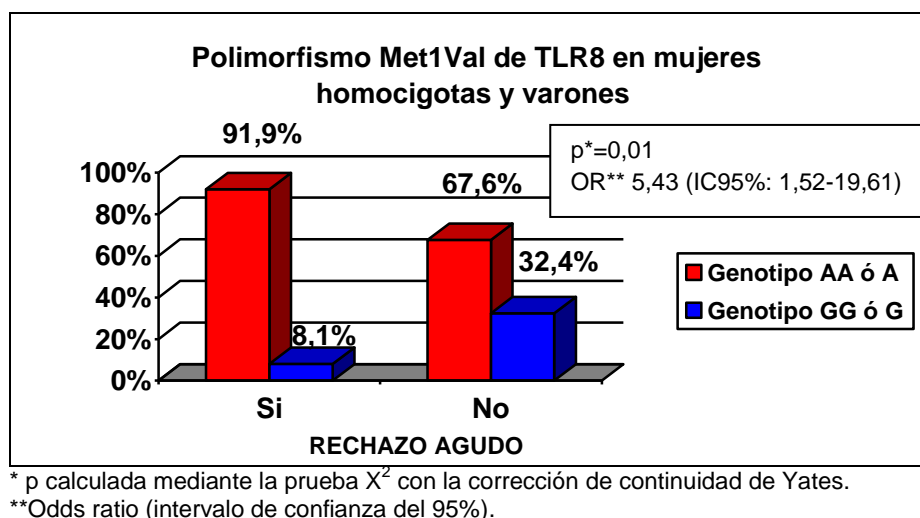


Figura 13. Distribución de los genotipos del polimorfismo Met1Val de TLR8 en mujeres homocigotas y hombres, según el rechazo agudo

En resumen, en el análisis univariante, los factores de riesgo de rechazo fueron la edad del receptor menor o igual a 50 años, la edad del donante menor o igual a 60 años, la suma de la edad del donante y del receptor menor o igual a 110 años, la inmunosupresión con ciclosporina respecto a tacrolimus y el genotipo AA en mujeres y A en varones del polimorfismo Met1Val de TLR8 (tabla 22).

Tabla 22. Factores de riesgo de rechazo agudo en el análisis univariante

| Variable | p* | OR**(IC95%) |
|--|--------|--------------------|
| Edad del receptor \leq 50 años | 0,027 | 2,67 (1,19- 5,96) |
| Edad del donante \leq 60 años | 0,001 | 16,5 (2,16-126,8) |
| Suma edad donante y receptor \leq 110 años | 0,009 | 3,57 (1,42-8,94) |
| Inmunosupresión con ciclosporina | <0,001 | 5,18 (2,31- 11,64) |
| Genotipo AA en mujeres y A en varones del polimorfismo Met1Val de TLR8 | 0,01 | 5,43 (1,52-19,61) |

* p calculada mediante la prueba χ^2 con la corrección de continuidad de Yates.

**Odds ratio (intervalo de confianza del 95%).

Factores de riesgo del rechazo agudo en el análisis multivariante

La suma de edad del donante y del receptor menor o igual a 110 años, la inmunosupresión con ciclosporina frente a tacrolimus y el genotipo A en varones y AA en mujeres del polimorfismo Met1Val de TLR8 se mantuvieron como variables independientes de riesgo de rechazo agudo (tabla 23). En cambio, el resto de los factores de riesgo identificados en el análisis univariante (la edad del receptor y la edad del donante) pierden su significación estadística tras el análisis multivariante.

Tabla 23. Factores de riesgo de rechazo agudo en el análisis multivariante

| Variable | p | OR*(IC95%) |
|--|-------|--------------------|
| Suma edad donante y receptor \leq 110 años | 0,049 | 3 (1- 8,95) |
| Inmunosupresión con ciclosporina | 0,003 | 4,26 (1,64-11,04) |
| Genotipo AA ó A del polimorfismo Met1Val de TLR8 | 0,005 | 7,06 (1,79- 27,81) |

*Odds ratio (intervalo de confianza del 95%)

La asociación de los factores de riesgo independientes identificados en el análisis multivariante no incrementó el riesgo de rechazo agudo (tabla 24).

Tabla 24. Efecto aditivo de los factores de riesgo de rechazo agudo

| Variable asociadas | p* | OR** (IC95%) |
|---|--------------------|-------------------|
| Suma edad donante y receptor \leq 110 años y Ciclosporina | 0,208 | 6,44 (0,65-64,21) |
| Genotipo^a AA ó A y | | |
| Suma edad donante y receptor \leq 110 años | 0,147 | 2,33 (0,85-6,37) |
| Ciclosporina | 0,000 | 6,04 (2,44-15) |
| Ciclosporina + suma de edad \leq 110 años | 0,208 ¹ | 6,44 (0,65-64,21) |

* p calculada mediante la prueba X^2 con la corrección de continuidad de Yates , excepto ¹calculada mediante la prueba X^2 de Pearson para tablas 3X2.

**Odds ratio (intervalo de confianza del 95%).

^a Genotipos del polimorfismo Met1 Val de TLR8

Discusión

La cirrosis por VHC es la principal indicación de trasplante hepático en el mundo, y la recidiva de la infección es prácticamente universal en los pacientes virémicos en el momento del trasplante. La evolución de la hepatitis postrasplante se caracteriza por una lesión crónica del injerto y una progresión más acelerada de la fibrosis que en los pacientes inmunocompetentes, con desarrollo de cirrosis en 20-54% de los pacientes en los 5 primeros años después del trasplante (29-31). Como consecuencia, la supervivencia de estos pacientes a largo plazo es significativamente menor que la de los pacientes trasplantados por otras etiologías (24).

Las características generales y demográficas de la población estudiada y la incidencia de rechazo agudo (53,3 % de los pacientes con inmunosupresión basada en ciclosporina y 18,1% de los pacientes con inmunosupresión basada en tacrolimus) son similares a las descritas en la literatura. La incidencia de recidiva grave (63,5%) es difícil de comparar con los datos publicados en la literatura, ya que los criterios para definir recidiva grave son muy variados en las distintas series. En este trabajo la recidiva grave se definió según el grado de fibrosis a los 2 y a los 5 años, pero en la literatura existe evidencia sobretodo en cuanto a la incidencia de cirrosis a los 3 años (11-38%) (101) y a los 5 años (20-54%) (28-31). La evolución de la recidiva del VHC viene determinada por la interacción de diferentes factores dependientes del propio huésped, del procedimiento quirúrgico, de las características del donante y de terapia inmunosupresora. Los factores que más parecen condicionar un pronóstico desfavorable son la edad avanzada del donante (44), el tratamiento con bolos de esteroides y/o anticuerpos policlonales (90-91), la lesión de preservación del injerto (57-58,167), la resistencia a la insulina o la diabetes (71-72) y la coinfección por el VIH (168). Otros factores, tales como el trasplante de donante vivo, de donante en asistolia (51), la infección por CMV (67-70) o el tipo de ICN empleado son más controvertidos, aunque sí parece claro que el exceso de inmunosupresión influye desfavorablemente en la evolución de la recidiva viral. Los resultados de este trabajo corroboran el impacto negativo de la edad del donante sobre la gravedad de la recidiva del VHC en el injerto. Además, también se confirma la influencia de la recidiva viral grave sobre la supervivencia del injerto, así como el impacto beneficioso de la

respuesta viral sostenida tras el tratamiento antiviral en la supervivencia del injerto. El hecho de que en esta serie se reproduzcan estos datos, ampliamente probados en la literatura, apoyan la idea de que los resultados obtenidos en nuestro trabajo respecto a los TLRs pudieran ser extrapolados a otros pacientes con trasplante hepático, al menos en los realizados en nuestro país.

Entre los factores genéticos, el polimorfismo rs12979860 de IL28 es un factor de riesgo conocido de recidiva grave del VHC y de no respuesta al tratamiento antiviral (73-76). Otros factores genéticos del receptor, como los polimorfismos de los TLRs están empezando a cobrar cada vez más protagonismo en la gravedad de la recidiva viral, y probablemente puedan explicar las diferencias interindividuales con respecto a la velocidad de progresión de la fibrosis en los pacientes trasplantados con recidiva VHC.

Los TLRs son parte fundamental de la respuesta inmune innata, que representa la primera línea de defensa del organismo frente a la invasión de patógenos microbianos. Existe evidencia en la literatura del papel de los TLRs en la patogenia y la progresión de las enfermedades hepáticas por el VHC (169-170), y en el rechazo agudo después del trasplante de órganos sólidos (110), aunque la información es escasa y contradictoria. La proteína core, las proteínas no estructurales y el ARN viral son ligandos exógenos para los TLRs, induciendo la síntesis de citocinas proinflamatorias, quimiocinas e IFNs tipo I, fundamentales en la respuesta antiviral y en la activación de la inmunidad adaptativa, responsable del aclaramiento del virus (120). No obstante, el VHC dispone de mecanismos que inhiben el funcionamiento correcto de los TLRs, lo que permite perpetuar la infección. Por otro lado, los TLRs reconocen además ligandos endógenos liberados como consecuencia de un traumatismo, daño o muerte celular, como ocurre durante el trasplante hepático por la lesión de isquemia-reperfusión del injerto. La estimulación de los TLRs por estos ligandos endógenos activa la respuesta inmune innata, que actúa como motor de arranque de la respuesta inmune adaptativa fundamental en la etiopatogenia del rechazo del injerto (110).

Por tanto, la activación de los TLRs podría desempeñar un papel fundamental en muchos aspectos de la biología del trasplante, como el rechazo

y la tolerancia del injerto, el daño por isquemia-reperfusión y la incidencia de infecciones después del trasplante. La existencia de un posible marcador genético, fácil de identificar por un método no invasivo, que predijera el riesgo de recidiva grave o de rechazo agudo antes del trasplante, permitiría individualizar tanto el tratamiento inmunosupresor, como identificar precozmente los receptores con mayor riesgo de progresión acelerada de la fibrosis.

El objetivo de este estudio ha sido valorar la influencia de 15 polimorfismos de sustitución de un único nucleótido de los diferentes TLRs en la gravedad de la recidiva viral y en el rechazo agudo en pacientes trasplantados por cirrosis por VHC. Para ello, se seleccionaron 128 pacientes de raza blanca, representativos de la población trasplantada en nuestro centro. Las distribuciones genotípicas encontradas en la población analizada son similares a las descritas en población sana española para los polimorfismos de TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 y TLR8 (171-173). No se han publicado las distribuciones genotípicas para TLR1 y TLR6 en población sana española. Las distribuciones del polimorfismo Ser249Pro de TLR6 en los pacientes de este estudio es similar a la descrita en población caucásica, no así la distribución de los dos polimorfismos de TLR1 (174). Estas diferencias en los polimorfismos de los TLR1 puede ser debida a un diferente ancestro genético o al hecho de que la población analizada es una población seleccionada de pacientes que fueron incapaces de aclarar la infección por VHC, precisando así mismo trasplante hepático.

I. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS TLRs Y GRAVEDAD DE LA RECIDIVA DEL VHC DESPUÉS DEL TRASPLANTE HEPÁTICO

En este trabajo se ha encontrado una asociación significativa entre el genotipo TT del polimorfismo Asp248Ser de TLR1 y el genotipo TT del polimorfismo -1486T>C de TLR9 con la gravedad de la recidiva del VHC después del trasplante hepático.

Hasta el momento no hay evidencia en la literatura sobre la relación del polimorfismo Asp248Ser de TLR1 y la infección crónica por VHC en la población general o la gravedad de la recidiva postrasplante. TLR1 se expresa en la superficie celular y está codificado por un gen situado en el cromosoma 4p14. Este TLR forma heterodímeros con TLR2, que reconoce las proteínas core y NS3 del VHC, con la consiguiente síntesis de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, TNF- α), fundamentales en la respuesta inmune innata y en la defensa frente a la invasión viral (175-177). Pero por otro lado, la activación de TLR2, junto con TLR3 y TLR4 en los monocitos, células dendríticas mieloides y células hepáticas, estimula la síntesis de citocinas y quimiocinas, con reclutamiento de células inflamatorias en el hígado, lo que origina la muerte citotóxica y apoptosis de las células infectadas, pero también de las células circundantes no infectadas. La destrucción de los hepatocitos estimula la fibrogenesis mediante la activación de las células estrelladas hepáticas, originando fibrosis hepática (120).

Eid *et al.* (156) han descrito que el polimorfismo Arg753Gln del TLR2 en homocigosis se asocia con desarrollo de cirrosis y pérdida del injerto en pacientes trasplantados por cirrosis por VHC. En nuestra población no se pudo analizar esta asociación porque sólo se han encontrado 3 individuos heterocigotos para este polimorfismo al igual que lo descrito por otros autores en la población española (173). La asociación encontrada entre el genotipo TT del polimorfismo Asp248Ser de TLR1 y la recidiva grave del VHC puede ser debida a que este polimorfismo, que se encuentra en la zona de unión a ligandos (178), podría generar un funcionamiento anómalo de TLR1, alterando de esta forma el reconocimiento de las proteínas virales por TLR2. De hecho, en pacientes con infección crónica por el VHC se ha demostrado que el

funcionamiento anómalo del TLR1 se asocia con disminución de la síntesis de IL10 y TNF- α inducida por TLR2 (177).

TLR9 se expresa en la membrana de los endosomas y está codificado por un gen situado en el cromosoma 3p21.3. Aunque el ligando natural de este TLR es el ADN de doble cadena, el VHC es capaz de activar TLR9, por un mecanismo desconocido hasta momento, induciendo la síntesis de IFN- α , fundamental para el aclaramiento del VHC. No obstante, como mecanismo de evasión inmune, el VHC es capaz de disminuir la síntesis de IFN inducido por TLR7/8 y TLR9 en las células dendríticas plasmacitoides, lo que conduce a la presentación defectuosa del antígeno por las células dendríticas. En consecuencia la activación de los linfocitos T es deficiente (120).

Por otra parte se ha descrito que los pacientes con infección por VHC presentan una menor expresión de TLR9 en las células de sangre periférica respecto a individuos sanos y además esta expresión tiene una correlación inversa con la carga viral (179). El polimorfismo -1486T>C de TLR9, está localizado en el promotor del gen y por lo tanto podría modificar la expresión de TLR9, lo que conduciría a una defensa ineficiente frente al VHC. Esta asociación ha sido evaluada en un estudio realizado por Wei XS *et al.* (180) en población asiática con infección crónica por VHC, no encontrando ninguna relación entre el polimorfismo de TLR9 y la evolución de la enfermedad. Los resultados diferentes de este estudio pueden ser debidos a las diferencias genéticas interraciales.

Los polimorfismos Asp248Ser de TLR1 y -1486T>C de TLR9 servirían para identificar un subgrupo de pacientes con mayor riesgo de desarrollar recidiva grave, según la presencia de uno o dos de estos genotipos. En este trabajo, la presencia simultánea de los dos polimorfismos de riesgo multiplica el riesgo de recidiva grave. Este resultado podría ser consecuencia de una menor respuesta inmune secundaria a la disfunción de dos vías de señalización diferentes, una dependiente de TLR2 y otra dependiente de TLR9.

En este trabajo también se han considerado otras variables relacionadas en la literatura con la gravedad de la recidiva viral, corroborando que la edad del donante mayor de 40 años es un factor de riesgo de recidiva grave del VHC, hecho ampliamente descrito por otros autores (43-47). Además, la

incidencia de recidiva grave aumenta de forma progresiva y significativa por cada década de edad del donante, hecho también conocido.

La coexistencia de los dos polimorfismos de riesgo en un trasplante con injerto de donante mayor de 40 años, identifica un subgrupo de pacientes con un muy alto riesgo de desarrollar recidiva grave (8,8 veces mayor que en los pacientes que no presentan ninguno de estos factores). Por ello, esta asociación debería evitarse.

Cuando se analizó la influencia de los diferentes ICN sobre la gravedad de la recidiva, se observó que tacrolimus es un factor de riesgo de recidiva grave respecto a ciclosporina, pero esta asociación perdió su significación estadística en el análisis multivariante. Ciclosporina es un fármaco que en estudios *in vitro*, inhibe la replicación del VHC, mientras que este efecto no se produce con el tacrolimus. Aún así, la mayoría de los trabajos no han observado ninguna diferencia en cuanto a la supervivencia del injerto en pacientes trasplantados por el VHC inmunodeprimidos con ciclosporina frente a los inmunodeprimidos con tacrolimus (80-84).

II. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS TLRs Y RECHAZO AGUDO

Otro objetivo de este trabajo fue investigar la influencia de los polimorfismos de los TLRs en la incidencia del rechazo agudo en pacientes trasplantados por cirrosis por VHC. A pesar de la inmunosupresión, el 20-40% de los receptores de trasplante hepático presentará a lo largo de su evolución clínica algún episodio de rechazo (181). En este trabajo se quiso investigar si además de los factores clásicamente relacionados con el desarrollo de rechazo agudo existe algún factor genético predictor del riesgo de rechazo que pudiera ayudar en adecuar la inmunosupresión al riesgo y evitar el exceso de inmunosupresión que tiene sus efectos secundarios perjudiciales, no solo por mayor gravedad de la recidiva sino también por su nefrotoxicidad, mayor riesgo cardiovascular y de desarrollo de tumores a largo plazo.

El rechazo representa la reacción inmunológica del receptor frente a proteínas extrañas del injerto (182). Durante el trasplante hepático se puede

liberar una importante cantidad de ligandos exógenos en caso de infección por bacterias, CMV ó VHC. También se liberan ligandos endógenos durante la lesión de isquemia-reperfusión del injerto. Estos ligandos, exógenos o endógenos activan los TLRs, que a través de diferentes vías de señalización intracelular activan a las células dendríticas implicadas en la presentación de antígenos y reclutan linfocitos B y T, con la consecuente activación de la inmunidad adquirida, fundamental en el rechazo o en la tolerancia inmune (108).

La importancia de los TLRs en el rechazo agudo y crónico en el trasplante de órganos sólidos ha sido ampliamente investigada en las últimas décadas. Así, diferentes polimorfismos genéticos o la expresión celular de los TLR2, TLR3 y TLR4, se han relacionado con el rechazo en la mayoría de los trasplantes (162-164,166), pero no hay estudios publicados sobre la relación de TLR8 y rechazo agudo del injerto. El polimorfismo Met1Val de TLR8 se asoció en este estudio con mayor riesgo de rechazo, observación de la que no hay información en la literatura.

El gen del TLR8 está localizado en el cromosoma Xp22.3, y por lo tanto la influencia de estos polimorfismos se analizó sólo mujeres homocigotas y en varones. Se observó que los genotipos AA en mujeres y A en varones del polimorfismo Met1Val de TLR8 son un factor de riesgo independiente de rechazo en este estudio. *El locus* para este TLR codifica dos variantes de *splicing*: TLR8v1 y TLR8v2. El polimorfismo Met1Val de TLR8 afecta la versión TLR8v2 que es la más preservada en la evolución y la más expresada. La variante de este polimorfismo hace que TLR8 se exprese menos y por lo tanto podría inducir de esta forma tolerancia inmune, lo que explicaría la relación del genotipo ancestral con mayor riesgo de rechazo agudo (183).

Al igual que TLR2 y TLR4 reconocen ligandos endógenos liberados durante la isquemia-reperfusión, TLR8 también podría reconocer ARN procedente de las células muertas durante el proceso del trasplante. TLR8 se expresa en la membrana endosomal y está implicado en el reconocimiento del ARN de cadena sencilla. Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron trasplantados por cirrosis por el VHC, virus que por un lado activa al TLR8,

pero que por otro lado interfiere con las vías de señalización dependientes de este receptor (157). Así que el VHC podría jugar un papel en la alteración funcional de este TLR y de sus vías de señalización. Por lo tanto, para dilucidar si la influencia del polimorfismo de TLR8 es sobre el rechazo en sí, o está condicionado por el VHC, sería necesario analizar esta asociación en pacientes trasplantados por otras etiologías diferentes al VHC.

Se han publicado estudios que demuestran que la expresión de TLR2 y TLR4 aumenta durante el rechazo agudo y disminuye tras el tratamiento con bolos de esteroides (161). Además, los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile de TLR4 se han asociado con rechazo agudo en el trasplante pulmonar y renal (162-163), pero esta asociación no se confirmó en los trabajos realizados en pacientes con trasplante hepático (164). En este estudio no se ha podido analizar la relación del polimorfismo Arg753Glu de TLR2, ya que sólo se encontraron 3 pacientes heterocigotos para la variante alélica. Los polimorfismos de TLR4, que también tienen una frecuencia de la variante alélica muy baja (FAM=0,04), no mostraron ninguna relación con la incidencia de rechazo agudo. Otro polimorfismo relacionado en la literatura con el rechazo agudo es el polimorfismo Leu412Phe de TLR3, existiendo resultados contradictorios en otros estudios (164-166). En este trabajo no se ha confirmado esta relación.

Además de los polimorfismos genéticos de los TLRs, se han analizado otros factores relacionados con el rechazo. Se ha comprobado que la edad del donante y del receptor y el tipo de ICN utilizado en la inmunosupresión se relacionan con el riesgo de rechazo agudo del injerto. Así, la suma de la edad del donante y del receptor menor o igual a 110 años y la inmunosupresión con ciclosporina, además del polimorfismo Met1Val de TLR8 fueron factores de riesgo independientes de rechazo agudo en el análisis multivariante aunque su coexistencia no incrementa el riesgo.

III. LIMITACIONES DEL TRABAJO Y APLICABILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS

En resumen, en este trabajo se han identificado factores genéticos asociados con la gravedad de la recidiva del VHC y la incidencia del rechazo. Al ser un análisis retrospectivo, con pacientes trasplantados a lo largo de un periodo de tiempo de 20 años, en el que han cambiado las pautas de inmunosupresión y ha variado tanto la edad del donante como del receptor, sería de gran utilidad validar estos resultados en otras cohortes de pacientes más amplias y homogéneas. Además sería de gran interés analizar si la influencia del polimorfismo de TLR8 sobre la incidencia del rechazo agudo es extrapolable a pacientes trasplantados por otras etiologías. En caso de confirmar estos resultados, los polimorfismos genéticos de los TLRs identificados como factores de riesgo de recidiva grave y de rechazo agudo podrían servir como marcadores genéticos, fáciles de determinar por técnicas no invasivas, que permitirían identificar precozmente los pacientes con mayor riesgo de presentar alguna de estas complicaciones después del trasplante hepático.

La presencia de estos factores de riesgo genéticos nos podría permitir actuar de forma preventiva, con limitación de uso de donantes añosos en los pacientes con mayor riesgo de recidiva grave y con monitorización más estrecha para evaluar la progresión de la fibrosis.

En cuanto al rechazo agudo, disponer de un marcador predictor de riesgo sería útil para poder adecuar la inmunosupresión y evitar de esta manera el exceso de inmunosupresión y sus consecuencias. Una limitación importante de los resultados sobre el rechazo agudo es la ausencia de confirmación histológica en 64,1 % de los casos. Sin embargo, el tiempo postrasplante de aparición inferior a 1 mes en el 94,4% de los casos, la exclusión de otras causas de disfunción del injerto (estudio de patología de vía biliar, vascular o infecciosa) y la normalización de los parámetros analíticos de función hepática tras intensificar la inmunosupresión o tras bolos de esteroides apoyan fuertemente el diagnóstico clínico de rechazo agudo.

Resumen

I. RESUMEN

La cirrosis por el VHC es la indicación más frecuente de trasplante hepático en el mundo occidental. La recidiva de la infección por VHC es universal si el ARN-VHC es detectable en el momento del trasplante, pero la gravedad de la recidiva es muy variable. Se han investigado factores genéticos con el intento de poder explicar esta gran variabilidad interindividual en la agresividad de la recidiva del VHC postrasplante.

Los TLRs son una familia de receptores fundamentales en la respuesta inmune innata. La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo y posteriormente activa la respuesta inmune adaptativa. Los TLRs reconocen patrones moleculares expresados por varios patógenos (ligandos exógenos), pero también ligandos endógenos liberados durante el trasplante hepático como consecuencia del daño o la muerte celular. Los TLRs parecen tener un papel importante en varios aspectos de la biología del trasplante, como por ejemplo el rechazo y la tolerancia inmune, el daño por isquemia-reperfusión y las infecciones postrasplante, pero la evidencia existente en la literatura es escasa y controvertida. Además, los TLRs son fundamentales en la respuesta inmune frente al VHC implicada en el aclaramiento del virus. Por otro lado, el propio virus dispone de mecanismos de evasión inmune dependientes de los TLRs, perpetuando de esta forma la infección. Por lo tanto, los TLRs podrían estar implicados en la gravedad de la recidiva del VHC y en el rechazo agudo después del trasplante hepático por cirrosis por VHC.

El objetivo de este estudio fue investigar si los polimorfismos genéticos de los TLRs se asocian con la gravedad de la recidiva viral o con la incidencia del rechazo agudo en pacientes con trasplante hepático por cirrosis por el VHC.

En este trabajo se han incluido 128 pacientes (edad $54,6 \pm 9$ años, 71,7% varones) que han recibido un primer trasplante hepático por cirrosis por VHC, con al menos seis meses de seguimiento y con muestra de ADN disponible. La gravedad de la recidiva del VHC fue inclasificable en diez pacientes y por lo tanto se excluyeron del análisis comparativo de la gravedad de la recidiva y los polimorfismos de los TLRs. Se han analizado 15 polimorfismos de sustitución de un único nucleótido mediante PCR a tiempo real y análisis de las

temperaturas de fusión en el sistema LightCycler 480 (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania).

Setenta y cinco (63,6%) de los 118 pacientes analizables desarrollaron recidiva grave del VHC después del trasplante hepático. En el análisis univariante, el genotipo TT del polimorfismo Asp248Ser de TLR1 y el genotipo TT del polimorfismo -1486T>C se asociaron con mayor riesgo de recidiva grave del VHC [(p=0,02; OR: 2,83; IC: 1,25-6,44) y (p=0,028; OR: 2,68; IC: 1,18-6,10) respectivamente]. La edad del donante mayor de 40 años y la inmunosupresión inicial con tacrolimus frente a ciclosporina también se asociaron con mayor riesgo de recidiva grave [(p=0,004; OR: 3,39; IC: 1,53-7,52) y (p=0,017; OR: 2,82; IC: 1,27-6,21) respectivamente]. En el análisis multivariante, sólo el genotipo TT del polimorfismo Asp248Ser de TLR1, el genotipo TT del polimorfismo -1486T>C de TLR9 y la edad del donante mayor de 40 años se confirmaron como factores de riesgo independientes de recidiva grave y su asociación incrementó el riesgo [(p=0,01; OR: 3,28; IC: 1,32-8,12), (p=0,036; OR: 2,65; IC: 1,06-6,60) y (p= 0,028; OR 2,7; IC: 1,11-6,58) respectivamente].

La supervivencia del injerto fue significativamente menor en los pacientes con recidiva grave del VHC respecto a los pacientes sin recidiva grave (p <0,001). La presencia de los tres factores de riesgo encontrados en este trabajo, se asoció con peor supervivencia del injerto con respecto a no tener ninguno o a tener uno o dos de los factores de riesgo, (p=0,001, p=0,007 y p=0,034 respectivamente).

Treinta y nueve (30,5%) de 128 pacientes presentaron rechazo agudo del injerto. En el análisis univariante se identificaron como factores de riesgo de rechazo agudo el genotipo TT del polimorfismo Met1Val de TLR8 (p= 0,01; OR: 5,43; IC: 1,52-19,61), la edad del receptor menor o igual a 50 años (p=0,027; OR: 2,67; IC: 1,19-5,96), edad del donante menor o igual a 60 años (p=0,001; OR: 16,5; IC: 2,16-126,8), la suma de edad del donante y del receptor menor o igual a 110 años (p=0,009; OR: 3,57; IC: 1,42-8,94) y la inmunosupresión inicial con ciclosporina frente a tacrolimus (p < 0,01; OR 5,18, IC: 2,31-11,64). En el análisis multivariante sólo el genotipo TT del polimorfismo Met1Val de TLR8, la suma de edad del donante y del receptor menor o igual a 110 años y la

inmunosupresión inicial con ciclosporina frente a tacrolimus se mantuvieron como factores de riesgo independientes de rechazo agudo [($p=0,005$; OR: 7,06; IC: 1,79-27,81), ($p=0,049$; OR: 3; IC: 1-8,95) y ($p=0,003$; OR: 4,26; IC: 1,64-11,04)].

En resumen, nuestros resultados muestran que el genotipo TT del polimorfismo Asp248Ser de TLR1 y el genotipo TT del polimorfismo -1486T>C de TLR9 son factores de riesgo independientes de recidiva grave del VHC, y el genotipo TT del polimorfismo Met1Val de TLR8 es factor de riesgo independiente de rechazo agudo en pacientes con trasplante hepático por cirrosis por VHC.

II. SUMMARY

Cirrhosis due to hepatitis C virus (HCV) infection is the most common indication for liver transplantation. The recurrence of HCV infection on the graft is universal in patients with HCV RNA detectable at time of transplantation, although the severity of recurrence is variable. Genetic factors have been investigated in order to explain the widely differing individual rates of fibrosis progression in chronic hepatitis C.

Toll-like receptors (TLRs) are pathogen recognition receptors that orchestrate the innate immune response and subsequent adaptive immune response. TLRs can be triggered by exogenous ligands of invading pathogens or by the release of endogenous ligands, such as that occurring through cellular injury during the transplantation process. They seem to play an important role in many facets of transplantation biology, including rejection and tolerance, ischemia/reperfusion injury and infections after transplantation but the evidence in the literature is scarce and controversial. TLRs are also critical to innate antiviral response and HCV alters TLRs functions to evade immune clearance. Whether TLRs play a role in the severity of HCV recurrence after liver transplantation is unknown.

The aim of this study was to investigate whether genetic polymorphisms of TLRs are associated with more aggressive recurrence of HCV or with increased risk of acute graft rejection after liver transplantation for cirrhosis due to HCV infection.

In this study 128 patients were included (age $54,6 \pm 9$ years, 71,7% males) who underwent liver transplantation because of HCV cirrhosis, with at least six months of follow-up and with available DNA sample. Severity of HCV recurrence on the graft was impossible to be classified in ten patients who were excluded from the comparative analysis of the severity of HCV recurrence and TLRs polymorphisms. We examined 15 single nucleotide polymorphisms of TLRs and genotyping was carried out by real-time PCR and analysis of the melting curves with the LightCycler 480 system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

Sixty-five (63,6%) of one hundred eighteen patients developed severe recurrence of HCV after liver transplantation. In the univariate analysis, TT genotype for TLR1 Asp248Ser and TT genotype for TLR9 -1486T>C were associated with a higher risk of severe recurrence of HCV versus non-TT genotypes [(p=0,02; OR: 2,83; CI: 1,25-6,44) and (p=0,028; OR: 2,68; CI: 1,18-6,10) respectively]. Donor age of more than 40 years and initial immunosuppression with tacrolimus versus cyclosporine were also found as risk factors for severe recurrence [(p=0,004; OR: 3,39; CI: 1,53-7,52) and (p=0,017; OR: 2,82; CI: 1,27-6,21) respectively]. In the multivariate analysis, only TT genotype for TLR1 Asp248Ser, TT genotype for TLR9 -1486T>C and donor age were confirmed as independent risk factors of severe recurrence of HCV and their association increased the risk [(p=0,01; OR: 3,28; CI: 1,32-8,12), (p=0,036; OR: 2,65; CI: 1,06-6,60) y (p=0,028; OR 2,7; CI: 1,11-6,58) respectively].

The overall survival of the graft was significantly lower in patients with severe recurrence of HCV in comparison with patients with non-severe recurrence (p< 0,001). Patients with the three risk factors had a poor survival than those without any, one or two risk factors (p=0,001; p=0,007 and p=0,034 respectively).

Thirty-nine (30,5%) of 128 patients developed acute graft rejection. The univariate analysis identified TT genotype of TLR8 Met1Val (p=0,01; OR 5,43; CI: 1,52-19,61), age less than 50 years at transplantation (p=0,027; OR: 2,67; CI: 1,19-5,96), donor age less than 60 years (p=0,001; OR 16,5; CI: 2,16-126,8) and initial immunosuppression with cyclosporine versus tacrolimus (p < 0,01; OR 5,18, CI: 2,31-11,64) as risk factors of acute rejection. In the multivariate analysis, the genotype of TLR8 Met1Val, the sum of donor and receptor age and initial immunosuppression with cyclosporine versus tacrolimus were independently associated with acute rejection [(p=0,005; OR: 7,06; CI: 1,79-27,81), (p=0,049; OR: 3; CI: 1-8,95) y (p=0,003; OR: 4,26; CI: 1,64-11,04)].

In conclusion, the TT genotype TLR1 Asp248Ser and TT genotype TLR9 -1486T>C are associated with higher risk of severe recurrence of HCV and TT genotype TLR8 Met1Val is an independent risk factor for acute rejection in patients with liver transplantation for cirrhosis due to HCV.

Conclusiones

Las conclusiones derivadas de los resultados de esta Tesis Doctoral se han agrupado en dos bloques:

Conclusiones relacionadas con la recidiva grave del VHC:

1. Los polimorfismos de los TLRs sí influyen en la gravedad de la recidiva.
2. Los genotipos TT de los polimorfismos Asp248Ser de TLR1 y -1486T>C de TLR9 son factores de riesgo independientes de recidiva grave.
3. La asociación de estos dos genotipos entre sí o con injerto de donante mayor de 40 años incrementa más el riesgo de recidiva grave, respecto a cada uno de los factores aislados.

Conclusiones relacionadas con el rechazo agudo

1. Los polimorfismos de los TLRs sí influyen en la incidencia del rechazo agudo.
2. Los genotipos AA en mujeres y A en varones del polimorfismo Met1Val de TLR8 son factores de riesgo independientes de rechazo agudo.

Bibliografía

1. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int* 2009; 29:74-81.
2. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:107–15.
3. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:558-67.
4. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infections. *Journal of Hepatol* 2014; 60:392-420.
5. Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, *et al.* A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int* 2011; 31:30–60.
6. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla D-C, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe, a review of available epidemiological data. Geneva: European Association for the Study of the Liver 2013. www.easl.eu
7. Bruguera M, Forns X. Hepatitis C en España. *Med Clin (Barc)*.2006; 127:113-7.
8. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, *et al.* Expanded classification of hepatitis C Virus into 7 genotypes and 67 Subtypes: updated criteria and assignment web resource. *Hepatology* 2014; 59:318-27.
9. Antaki N, Craxi A, Kamal S, Moucari R, Van der Merwe S, Haffar S, *et al.* The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5, and 6: an international consensus report. *Liver Int* 2010; 30:342–55.
10. Moreno JM, Fernández M, Portero F, Boullosa E, Rubio E, Martos S, *et al.* Prevalence of hepatitis C virus genotypes in a Spanish liver transplant unit. *Transplant Proc.* 2005; 37:1486-7.
11. Allison RD, Conry-Cantilena C, Kozion D, Schechterly C, Ness P, Gible, *et al.* A 25-year study of the clinical and histologic outcomes of hepatitis C virus infection and its modes of transmission in a cohort of initially asymptomatic blood donors. *J Infect Dis* 2012; 206:654-61.
12. Taylor LE, Swan T, Mayer K. HIV co-infection with hepatitis C virus: evolving epidemiology and treatment paradigms. *Clin Infect Dis* 2012; 55(S1):S33-S42.
13. Deterding K, Wiegand J, Gruner N, Wedemeyer H. Medical procedures as a risk factor for HCV infection in developed countries: do we neglect a significant problem in medical care? *J Hepatol* 2008; 48:1019–20.
14. Martinez-Bauer E, Forns X, Armelles M, Planas R, Sola R, Vegara M, *et al.* Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. *J Hepatol* 2008; 48:20-7.

15. Cruz JM, Piera L, Bragg-Gresham JL, Feldman H, Port FK. Resultados del estudio internacional de hemodiálisis DOPPS en España y Europa. *Nefrología* 2003; 23:437-43.
16. NIH Consensus Statement of Management of Hepatitis C. NIH Consensus State Sci Statements 2002;19:1-46.
17. van de Laar TJ, Matthews GV, Prins M, Danta M. Acute hepatitis C in HIV infected men who have sex with men: an emerging sexually transmitted infection. *AIDS* 2010; 24:1799–812.
18. Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol* 2008; 48:148–62.
19. Modi AA, Feld JJ, Park Y, Kleiner DE, Everhart JE, Liang TJ, *et al.* Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology* 2010; 51:201–9.
20. Ohfuji S, Fukushima W, Tanaka T, Habu D, Tamori A, Sakaguchi H, *et al.* Coffee consumption and reduced risk of hepatocellular carcinoma among patients with chronic type C liver disease: a case-control study. *Hepatol Res* 2006; 36:201–8.
21. John-Baptiste A, Krahn M, Heathcote J, Laporte A, Tomlinson G. The natural history of hepatitis C infection acquired through injection drug use: metaanalysis and meta-regression. *J Hepatol* 2010; 53:245–51.
22. Deuffic-Burban S, Deltenerre P, Buti M, Stroffolini T, Parkes J, Muhleberger N, *et al.* Predicted Effects of Treatment for HCV Infection Vary Among European Countries. *Gastroenterology* 2012; 143:974-85.
23. Adam R, McMaster P, O'Grady JG, *et al.* Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European liver transplant registry. *Liver Transpl* 2003; 9:1231–43.
24. Sociedad Española de Trasplante Hepático y Organización Nacional de Trasplantes. Registro Español de Trasplante Hepático. Memoria de Resultados 2012.
25. Wright TL, Donegan E, Hsu HH, Ferrell L, Lake JR, Kim M, *et al.* Recurrent and acquired hepatitis C viral infection in liver transplant recipients. *Gastroenterology* 1992; 103:317-22.
26. Feray C, Samuel D, Thiers V, Gigou M, Pichon F, Bismuth A, *et al.* Reinfection of liver graft by hepatitis C virus after liver transplantation. *J Clin Invest* 1992; 89:1361-5.

27. Sallie R, Cohen AT, Tibbs CJ, Portmann BC, Rayner A, O'Grady JG, *et al.* Recurrence of hepatitis C following orthotopic liver transplantation: a polymerase chain reaction and histological study. *J Hepatol* 1994; 21:536-42.
28. Gane EJ, Portmann BC, Naoumov NV, Smith HM, Underhill JA, Donaldson PT, *et al.* Long-term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation. *N Engl J Med* 1996; 334:815–20.
29. Prieto M, Berenguer M, Rayón JM, Córdoba J, Argüello L, Carrasco D, *et al.* High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes. *Hepatology* 1999; 29:250–6.
30. Sreekumar R, Gonzalez-Koch A, Maor-Kendler Y, Batts K, Moreno-Luna L, Poterucha J, *et al.* Early identification of recipients with progressive histologic recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32:1125–30.
31. Lai JC, Verna EC, Brown Jr RS, O'Leary JG, Trotter JF, Forman LM, *et al.* Consortium to Study Health Outcomes in HCV Liver Transplant Recipients (CRUSH-C). Hepatitis C virus-infected women have a higher risk of advanced fibrosis and graft loss after liver transplantation than men. *Hepatology* 2011; 54:418–24.
32. Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR. The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122:889-96.
33. García-Retortillo M, Forns X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M, *et al.* Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35:680–7.
34. Hu Y, Shahidi A, Park S, Guilfoyle D, Hirshfield I. Detection of extrahepatic hepatitis C virus replication by a novel highly sensitive, single-tube nested polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 2003; 119:95-100.
35. Lerat H, Berby, Trabaud MA, Vidalin O, Major M, Trepo C, *et al.* Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 1996; 97:845-51.
36. Dahari H, Feliu A, Garcia-Retortillo M, Forns X, Neumann AU. Second hepatitis C replication compartment indicated by viral dynamics during liver transplantation. *J Hepatology* 1996; 24:1351-4.
37. Powers KA, Ribeiro RM, Patel K, Pianko S, Nyberg L, Pockros P, *et al.* Kinetics of hepatitis C virus reinfection after liver transplantation. *Liver Transplantation* 2006; 12:207-16.

38. Fukemoto T, Berg T, Ku Y, Bechstein WO, Knoop M, Lemmens HP, et al. Viral dynamics of hepatitis C early after orthotopic liver transplantation: evidence of rapid turnover of serum virions. *Hepatology* 1996; 24:1351-4.
39. Berenguer M, Prieto M, Rayón JM, Mora J, Pastor M, Ortiz V, et al. Natural history of clinically compensated hepatitis-C virus related graft cirrhosis following liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32:852-8.
40. Schluger LK, Sheiner PA, Thung SN, Lau JY, Min A, Wolf DC, et al. Severe recurrent cholestatic hepatitis C following orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1996; 23:971-6.
41. Firpi RJ, Clark V, Soldevila-Pico C, Morelli G, Cabrera R, Levy C, et al. The natural history of hepatitis C cirrhosis after liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15:1063-71.
42. Reddy MS, Varghese J, Venkataraman, Rela M. Matching donor to recipient in liver transplantation: Relevance in clinical practice. *World J Hepatol* 2013; 5:603-11.
43. Wiesner R, Sorell M, Villamil F. International Liver Transplantation Society Expert Panel. Report of the first ILTS expert panel consensus conference of liver transplantation and hepatitis C. *Liver Transpl* 2003; 9:S1-9.
44. Berenguer M, Prieto M, San Juan F, Rayón JM, Martínez F, Carrasco D, et al. Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* 2002; 36:202-10.
45. Burak KW, Kremers WK, Batts KP, Wiesner RH, Rosen CB, Razonable RR, et al. Impact of cytomegalovirus infection, year of transplantation, and donor age on outcomes after liver transplantation for hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8: 362-9.
46. Wali M, Harrison RF, Gow PJ, Mutimer D. Advancing donor liver age and rapid fibrosis progression following transplantation for hepatitis C. *Gut* 2002; 51:248-52.
47. Machicao VI, Bonatti H, Krishna M, Aqel BA, Lukens FJ, Nguyen JH, et al. Donor age affects fibrosis progression and graft survival after liver transplantation for hepatitis C. *Transplantation* 2004; 77:84-92.
48. Nocito A, El-Badry AM, Clavien PA. When is steatosis too much for transplantation? *J Hepatol* 2006; 45:483-513.
49. Berenguer M. Risk of extended criteria donors in hepatitis C virus – positive recipients. *Liver Transpl* 2008; 14:S45-50.

50. Berenguer M, Crippin J, Gish R, Bass N, Bostrom A, Netto G, *et al.* A model to predict severe HCV-related disease following liver transplantation. *Hepatology* 2003; 38:34–41.
51. Durand F, Renz JF, Alkofer B, Burra P, Clavien PA, Porte RJ, *et al.* Report of the Paris consensus meeting on expand criteria donors in liver transplantation. *Liver Transpl* 2008;14:1694-707.
52. Arenas JI, Vargas HE, Rakela J. The use of hepatitis C infected grafts in liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; 9:48–51.
53. Samuel D, Forns X, Berenguer M, Trautwein C, Burroughs A, Rizzetto M, *et al.* Report of the monothematic EASL conference on liver transplantation for viral hepatitis. *J Hepatol* 2006; 45:127–43.
54. Khapra AP, Agarwal K, Fiel MI, Kontorinis N, Hossain S, Emre S, *et al.* Impact of donor age on survival and fibrosis progression in patients with hepatitis C undergoing liver transplantation using HCV+ allografts. *Liver Transpl* 2006; 12:1496–503.
55. Ballarin R, Cucchetti A, Spaggiari M, Montalti R, Di Benedetto F, Nadalin S, *et al.* Long-term follow-up and outcome of liver transplantation from anti-hepatitis C virus-positive donors: a European multicentric case-control study. *Transplantation* 2011; 91:1265–72.
56. Northup PG, Argo CK, Nguyen DT, McBride MA, Kumer SC, Schmitt TM, *et al.* Liver allografts from hepatitis C positive donors can offer good outcomes in hepatitis C positive recipients: a US national transplant registry analysis. *Transpl Int* 2010; 23:1038–44.
57. Briceño J, Ciria R, Pleguezuelo M, Naranjo A, Sánchez-Hidalgo J, Ruíz-Rabelo J *et al.* Contribution of marginal donors to liver transplantation for hepatitis C virus infection. *Transplant Proc* 2007; 39: 2297–9.
58. Briceño J, Marchal T, Padillo J, Solórzano G, Pera C. Influence of marginal donors on liver preservation injury. *Transplantation* 2002; 74:522–6.
59. Baron PW, Sindram D, Higdon D, Howell DN, Gottfried MR, Tuttle-Newhall JE, *et al.* Prolonged rewarming time during allograft implantation predisposes to recurrent hepatitis C infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2000; 6: 407–12.
60. Feray C, Caccamo L, Alexander GJM, Ducot B, Gugenheim J, Casanovas T, *et al.* European collaborative study on factors influencing outcome after liver transplantation for hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 117:619–25.

61. Gallegos-Orozco JF, Yosephy A, Noble B, Aqel BA, Byrne TJ, Carey EJ, *et al.* Natural history of post-liver transplantation hepatitis C: a review of factors that may influence its course. *Liver Transpl* 2009; 15:1872–81.
62. Feray C, Gigou M, Samuel D, Paradis V, Mishiro S, Maertens G, *et al.* Influence of the genotypes of hepatitis C virus on the severity of recurrent liver disease after liver transplantation. *Gastroenterology* 1995; 108:1088–96.
63. Neumann UP, Berg T, Bahra M, Puhl G, Guckelberger O, Langrehr JM, *et al.* Long-term outcome of liver transplants for chronic hepatitis C: A 10-year follow-up. *J Hepatol* 2004; 41:830–6.
64. Gane EJ, Naoumov NV, Qian JP, Mondelli MU, Maertens G, Portmann BC, *et al.* A longitudinal analysis of hepatitis C virus replication following liver transplantation. *Gastroenterology* 1996; 110:167–77.
65. Papatheodoridis GV, Barton SGR, Andrew D, Clewley G, Davies S, Dhillon AP, *et al.* Longitudinal variation in hepatitis C virus (HCV) viraemia and early course of HCV infection after liver transplantation for HCV cirrhosis: the role of different immunosuppressive regimens. *Gut* 1999; 45:427–34.
66. Shakel NA, Jamias J, Rahman W, Prakoso E, Strasser SI, Koorey DJ *et al.* Early high peak hepatitis C viral load levels independently predict hepatitis C-related liver failure post-liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15:709–18.
67. Rosen HR, Sunwen C, Corless CL, Gretch DR, Flora KD, Boudousquie A, *et al.* Cytomegalovirus viremia: risk factor for allograft cirrhosis after liver transplantation for hepatitis C. *Transplantation* 1997; 64:721–6.
68. Sánchez-Fueyo A, Restrepo JC, Quintó L, Bruguera M, Grande L, Sánchez-Tapias JM, *et al.* Impact of the recurrence of hepatitis C virus infection after liver transplantation on the long-term viability of the graft. *Transplantation* 2002; 73: 56–63.
69. Humar A, Kumar D, Raboud J, Caliendo AM, Moussa G, Levy G, *et al.* Interactions between cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and the recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transpl* 2002; 2:461–6.
70. Nebbia G, Mattes FM, Cholangitas E, Garcia-Diaz A, Samonakis DN, Burroughs AK, *et al.* Exploring the bidirectional interactions between human cytomegalovirus and hepatitis C replication after liver retransplantation. *Liver Transpl* 2007; 13:130–5.
71. Hanouneh IA, Feldstein AE, McCullough AJ, Miller C, Aucejo F, Yerian L, *et al.* The significance of metabolic syndrome in the setting of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Liver Transpl* 2008; 14:1287–93.

72. Foxton MR, Quaglia A, Muiesan P, Heneghan MA, Portmann B, Norris S, *et al.* Impact of diabetes mellitus on fibrosis progression in patients transplanted for hepatitis C. *Am J Transplant* 2006; 6:1922–9.
73. Coto-Llerena M, Pérez-Del-Pulgar S, Crespo G, Carrión JA, Martínez SM, Sánchez-Tapias JM, *et al.* Donor and recipient IL28B polymorphisms in HCV-infected patients undergoing antiviral therapy before and after liver transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11:1051–7.
74. Charlton MR, Thompson A, Veldt BJ, Watt K, Tillmann H, Poterucha JJ, *et al.* Interleukin-28B polymorphisms are associated with histological recurrence and treatment response following liver transplantation in patients with hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2011; 53:317–24.
75. Duarte-Rojo A, Deneke MG, Charlton MR. IL28B polymorphism in hepatitis C and liver transplantation. *Liver Transpl* 2013; 19:49–58.
76. Cisneros E, Baños I, Citores MJ, Duca A, Salas C, Noblejas A, *et al.* Increased risk of severe hepatitis C virus recurrence after liver transplantation in patients with a T allele of IL28B rs12979860. *Transplantation* 2012; 94:275–80.
77. Rosen HR, Grecht DR, Oehlke M, Flora KD, Benner KG, Rabkin JM, *et al.* Timing and severity of initial hepatitis C recurrence as predictors of long-term liver allograft injury. *Transplantation* 1998; 65:1178–82.
78. Katz LH, Mor E, Brown M, Bar-Nathan N, Shaharabani E, Sulkes J, *et al.* Recurrent hepatitis C virus disease after liver transplantation and concurrent biliary tract complications: poor outcome. *Clin Transplant* 2006; 20:465–70.
79. Verna EC, De Martin E, Burra P, Neri D, Gaglio PJ, Emond JC, *et al.* The impact of hepatitis C and biliary complications on patient and graft survival following liver transplantation. *Am J Transpl* 2009; 9:1398–405.
80. Berenguer M, Royuela A, Zamora J. Immunosuppression with calcineurin inhibitors with respect to the outcome of HCV recurrence after liver transplantation: results of a meta-analysis. *Liver Transpl* 2007; 13:21–9.
81. Levy G, Grazi GL, Sanjuan F, Wu Y, Mühlbacher F, Samuel D, *et al.* 12-month follow-up analysis of a multicenter, randomized, prospective trial in de novo liver transplant recipients (LIS2T) comparing cyclosporine microemulsion (C2 monitoring) and tacrolimus. *Liver Transpl* 2006; 12:1464–72.
82. O'Grady JG, Hardy P, Burroughs AK, Elbourne D. Randomized controlled trial of tacrolimus versus microemulsified cyclosporin (TMC) in liver transplantation: poststudy surveillance to 3 years. *Am J Transplant* 2007; 7:137–41.

83. Berenguer M, Aguilera V, Prieto M, San Juan F, Rayón JM, Benlloch S, *et al.* Effect of calcineurin inhibitors on survival and histologic disease severity in HCV-infected liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2006; 12:762–7.
84. Berenguer M. What determines the natural history of recurrent hepatitis C after liver transplantation? *J Hepatol* 2005; 42:448–79.
85. Berenguer M, Aguilera V, San Juan F, Benlloch S, Rubin A, López-Andujar R, *et al.* Effect of calcineurin inhibitors in the outcome of liver transplantation in hepatitis c virus-positive recipients. *Transplantation* 2010; 15:1204–9.
86. Samonakis DN, Triantos CK, Thalheimer U, Quaglia A, Leandro G, Teixeira R, *et al.* Immunosuppression and donor age with respect to severity of HCV recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11:386–95.
87. McCaughan GW, Zekry A. Mechanisms of HCV reinfection and allograft damage after liver transplantation. *J Hepatol* 2004; 40:368–74.
88. Lake JR. The role of immunosuppression in recurrence of hepatitis C. *Liver Transpl* 2003; 9:S63–6.
89. Melero JL, Berenguer M. Optimum minimization strategies in hepatitis C virus infected liver transplant. *Cur Op Org Transpl* 2007; 12:641–6.
90. Berenguer M, Prieto M, Córdoba J, Rayón JM, Carrasco D, Olaso V, *et al.* Early development of chronic active hepatitis in recurrent hepatitis C virus infection after liver transplantation: association with treatment of rejection. *J Hepatol* 1998; 28:756–63.
91. Charlton M. Impact of immunosuppression and acute rejection on recurrence of hepatitis C: results of the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases liver transplantation database. *Liver Transpl Surg* 1999; 5: S107–14.
92. Zekry A, Gleeson M, Guney S, McCaughan GW. A prospective cross-over study comparing the effect of mycophenolate versus azathioprine on allograft function and viral load in liver transplant recipients with recurrent chronic HCV infection. *Liver Transpl* 2004; 10:52–7.
93. Jain A, Kashyap R, Demetris AJ, Eghstesad B, Pokharna R, Fung JJ. A prospective randomized trial of mycophenolate mofetil in liver transplant recipients with hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8:40–6.
94. Calmus Y, Scheele JR, Gonzalez-Pinto I, Jaurrieta EJ, Klar E, Pageaux GP, *et al.* Immunoprophylaxis with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody, in combination with azathioprine- containing triple therapy in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2002; 8:123–31.
95. Neuhaus P, Clavien PA, Kittur D, Salizzoni M, Rimola A, Abeywickrama K, *et al.* Improved treatment response with basiliximab immunoprophylaxis after liver

- transplantation: results from a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Liver Transpl* 2002; 8:132–42.
96. Harper SJ, Gelson W, Harper IG, Alexander GJ, Gibbs P. Switching to sirolimus-based immune suppression after liver transplantation is safe and effective: a single-center experience. *Transplantation* 2011; 91:128–32.
97. Asthana S, Toso C, Meeberg G, Bigam DL, Mason A, Shapiro J, *et al.* The impact of sirolimus on hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Can J Gastroenterol* 2011; 25:28–34.
98. Germani G, Pleguezuelo M, Villamil F, Vaghjiani S, Tsochatzis E, Andreana L, *et al.* Azathioprine in liver transplantation: a reevaluation of its use and a comparison with mycophenolate mofetil. *Am J Transplant* 2009; 9:1725–31.
99. Stangl JR, Carroll KL, Illichmann M, Striker R. Effect of antimetabolite immunosuppressants on Flaviviridae, including hepatitis C virus. *Transplantation* 2004; 77:562–7.
100. Sheiner PA, Scwaartz ME, Mor E, Schluger LK, Theise N, Kishikawa K, *et al.* Severe or multiple rejection episodes are associated with early recurrence of hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1995; 21:30-4.
101. Berenguer M, Schuppan D. Progression of liver fibrosis in post-transplant hepatitis C: Mechanisms, assessment and treatment. *J Hepatology* 2013; 58:1028-41.
102. Benlloch S, Heredia L, Barquero C, Rayon JM, Pina R, Aguilera V, *et al.* Prospective validation of a non-invasive index for prediction liver fibrosis in hepatitis C virus-infected liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2009; 15:1798-807.
103. Carrión JA, Torres F, Crespo G, Miguel R, García-Valedecasas JC, Navasa M, *et al.* Liver stiffness identifies two different patterns of fibrosis progression in patients with hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 2010; 51:23-34.
104. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11:373–84.
105. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010; 327:291–5.
106. Hournef MW, Henriques-Normark S. The function and biological role of Toll-like receptors in infectious diseases: an update. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21:304-321.

107. Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, *et al.* The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol. Rev.* 2007; 220:60–81.
108. Alegre ML, Leemans J, Le Moine A, Florquin S, De Wilde V, Chong A, *et al.* The multiple facets of toll-like receptors in transplantation biology. *Transplantation* 2008; 86:1-9.
109. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immune response. *Cell* 2006; 124:783-801.
110. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, *et al.* The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:13766-71.
111. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of innate immune response. *Nature* 2000; 406:782-7.
112. Barton GM, Madzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:380-3.
113. Schwartz DA, Cook DN. Polymorphisms of Toll-like receptors and human disease. *Clin Infect Dis* 2005; 41 Suppl 7:S403-S407.
114. Misch EA, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114:347-60.
115. Sanchez E, Orozco G, Martin J. Toll-like receptors and human pathology. *Immunologia* 2004; 23:328-38.
116. Lee YH, Lee HS, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between TLR polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30:262-5.
117. Arbour NC, Lorenz E, Scutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M *et al.* TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187-91.
118. Medvedev AE. Toll-like receptor polymorphisms, inflammatory and infectious diseases, allergies and cancer. *J Interf Cytok Res* 2013; 33:467-84.
119. Schröder NW, Schuman RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:156-64.
120. Sawhney R, Visvanathan K. Polymorphisms of Toll-like receptors and their pathways in viral hepatitis. *Antiviral Therapy* 2011; 16:443-58.
121. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat. Immunol* 2004; 5:975-9.

122. Gastaminza P, Dryden KA, Boyd B, Wood MR, Law M, Yeager M, *et al.* Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J Virol.* 2010; 84:10999-1009.
123. Merz A, Long G, Hiet MS, Brügger B, Chlanda P, Andre P, *et al.* Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem* 2011; 286:3018-32.
124. Georgel P, Schuster C, Zeisel MJ, Stoll-Keller F, Berg T, Bahram S, *et al.* Virus-host interactions in hepatitis c virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. *Trends Mol Med* 2010; 16:277-86.
125. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV: Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J. Exp Med* 2001; 194:1395–406.
126. Nelson DR, Marousis CG, Ohno T, Davis GL, Lau JY. Intrahepatic hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte activity and response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 28:225–30.
127. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, *et al.* Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 117:933–41.
128. Sobue S, Nomura T, Ishikawa T, Ito S, Saso K, Ohara H, *et al.* Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J. Gastroenterol* 2001; 36:544–51.
129. Eckels DD, Wang H, Bian TH, Tabatabai N, Gill JC. Immunobiology of hepatitis C virus (HCV) infection: the role of CD4 T cells in HCV infection. *Immunol Rev* 2000; 174:90–7.
130. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, *et al.* Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98:706–14.
131. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, *et al.* HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003; 302:659–62.
132. Wertheimer AM, Miner C, Lewinsohn DM, Sasaki AW, Kaufman E, Rosen HR. Novel CD4+ and CD8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology* 2003; 37:577–89.
133. McHutchison JG, Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Shiffman M, Afdhal NH, *et al.* Phase 1B, randomized, double-blind, dose-escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus. *Hepatology* 2007; 46:1341–9.

134. Kanto T, Hayashi N. Innate immunity in hepatitis C virus infection: interplay among dendritic cells, natural killer cells and natural killer T cells. *Hepatol Res* 2007; 37(Suppl. 3):S319–26.
135. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:65–91.
136. Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, *et al.* Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN- α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2003; 170:1249–56.
137. Dolganiuc A, Oak S, Kodys K, Golenbock DT, Finberg RW, Kurt-Jones E, *et al.* Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathway and inflammatory activation. *Gastroenterology* 2004; 127:1513–24.
138. Matsuguchi T, Musikachoen T, Ogawa T, Yoshikai Y. Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol* 2000; 165:5767–72.
139. Machida K, Cheng KT, Sung VM, Levine AM, Fount S, Lai MM. Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6. *J Virol* 2006; 80:866–74.
140. Sato K, Ishikawa T, Okumura A, Yamauchi T, Sato S, Ayada M, *et al.* Expression of Toll-like receptors in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22:1627–32.
141. Riordan SM, Skinner NA, Kurtovic J, Locarnini S, McIver CJ, Williams R, *et al.* Toll-like receptor expression in chronic hepatitis: correlation with pro-inflammatory cytokine levels and liver injury. *Inflamm Res* 2006; 55:279–85.
142. Wang N, Liang Y, Devaraj S, Wang J, Lemon SM, Li K. Toll-like receptors 3 mediates establishment of an antiviral state against hepatitis C virus in hepatoma cells. *J Virol* 2009; 83:9824–34.
143. Takasaki K, Asabe S, Wieland S, Garaigorta U, Gastaminza P, Isogawa M, *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:7431–6.
144. Zhang YL, Guo YJ, Bin L, Sun SH. Hepatitis C virus single-stranded RNA induces innate immunity via Toll-like receptor 7. *J Hepatol* 2009; 51:29–38.
145. Lee J, Wu CC, Lee KJ, Chuang TH, Katakura K, Liu YT, *et al.* Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:1828–33.

146. Agaue S, Perrin-Cocon L, Andre P, Lotteau V. Hepatitis C lipo-Viro-particle from chronically infected patients interferes with TLR4 signaling in dendritic cell. *PLoS One* 2007; 2:e330.
147. Otsuka M, Kato N, Moriyama M, Taniguchi H, Wang Y, Dharel N, *et al.* Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* 2005; 41:1004–12.
148. Abe T, Kaname Y, Hamamoto I, Tsuda Y, Wen X, Taguwa S, *et al.* Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *J Virol* 2007; 81:8953–66.
149. Chang S, Kodys K, Szabo G. Impaired expression and function of toll-like receptor 7 in hepatitis C virus infection in human hepatoma cells. *Hepatology* 2010; 51:35–42.
150. Shiina M, Rehmann B. Cell culture-produced hepatitis C virus impairs plasmacytoid dendritic cell function. *Hepatology* 2008; 47:385–95.
151. Huang H, Shiffman ML, Friedman S, Venkatesh R, Bzowej N, Abar OT, *et al.* A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; 46:297-306.
152. Li Y, Chang M, Abar O, Garcia V, Rowland C, Catanese J, *et al.* Multiple variants in toll-like receptor 4 gene modulate risk of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *J Hepatol* 2009;51 :750-7.
153. Askar E, Bregadze R, Mertens J, Schweyer S, Rosenberger A, Ramadori G, *et al.* TLR3 gene polymorphisms and liver disease manifestation in chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2009 ; 81:1204-11.
154. Schott E, Witt H, Neumann K, Taube S, Oh DY, Schreier E, *et al.* A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. *J Hepatol* 2007; 47:203-11.
155. Schott E, Witt H, Neumann K, Bergk A, Halangk J, Weich V, *et al.* Association of TLR7 single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon- α -based therapy. *J Viral Hepat* 2008; 15:71–8.
156. Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Association between toll-like receptor polymorphisms and the outcome of liver transplantation for chronic hepatitis C virus. *Transplantation* 2007; 84:511–6.
157. Dhillon N, Walsh L, Krüger B, Ward SC, Godbold JN, Radwan M, *et al.* A single nucleotide polymorphism of toll-like receptor 4 identifies the risk of developing graft failure after liver transplantation. *J Hepatol* 2010; 53:67-72.

158. Howell J, Sawhney R, Skinner N, Gow P, Angus P, Ratnam D, Visvanathan *et al.* Toll-like receptor 3 and 7/8 function is impaired in hepatitis C rapid fibrosis progression post-liver transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13:943-53.
159. Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. Intrahepatic immunity: a tale of two sites? *Trends Immunol* 2005; 26:512-7.
160. Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 2008; 48:322-35.
161. Deng JF, Geng L, Qian YG, Li H, Wang Y, Xie HY, *et al.* The role of toll-like receptors 2 and 4 in acute allograft rejection after liver transplantation. *Transplant Proc* 2007; 39:3222-4.
162. Palmer SM, Burch LH, Davis RD, Herczyk WF, Howell DN, Reinsmoen NL, *et al.* The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:628-3.
163. Ducloux D, Deschamps M, Yannarakis M, Ferrand C, Bamoulid J, Saas P, *et al.* Relevance of toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int* 2005; 67:2454-61.
164. Citores MJ, Baños I, Noblejas A, Rosado S, Castejon R, Cuervas-Mons V. Toll-like receptor 3 L412F polymorphism may protect against acute graft rejection in adult patients undergoing liver transplantation for hepatitis C related cirrhosis. *Transplant Proc* 2011; 43:2224-6.
165. Hwang YH, Ro H, Choi I, Kim H, Oh KH, Hwang JI, *et al.* Impact of polymorphisms of TLR4/CD14 and TLR3 on acute rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 2009; 88:699-705.
166. Kruger B, Banas MC, Walberer A, Böger CA, Farkas S, Hoffmann U, *et al.* A comprehensive genotype-phenotype interaction of different toll-like receptor variations in a renal transplant cohort. *Clin Sci* 2010; 119:535:534-44.
167. Watt KD, Lyden ER, Gulizia JM, McCashland TM. Recurrent hepatitis C posttransplant: early preservation injury may predict poor outcome. *Liver Transpl* 2006; 12:134-9.
168. Duclos-Valleé JC, Féray C, Sebah M, Teicher E, Roque-Alfonso AM, Roche B, *et al.* Survival and recurrence of HCV after liver transplantation in patients coinfecting with HIV virus and HCV. *Hepatology* 2008; 47:407-17.
169. Mencin A, Kluwe J, Schwabe RF. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut* 2009; 58:704-20.
170. Testro AG, Visvanathan K. Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24:943-54.

171. Martínez-Robles E, Yebra-Bango M, Mellor-Pita S, Tutor-Ureta P, Vargas JA, Citores MJ. Genotypic distribution of common variants of endosomal toll-like receptors in healthy spanish women. A comparative study with other populations. *Eur J Hum Genet*, en prensa.
172. Sánchez E, Callejas-Rubio JL, Sabio JM, González-Gay MA, Jiménez-Alonso J, Micó L, *et al.* Investigation of TLR5 and TLR7 as candidate genes for susceptibility to systemic lupus erithematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27:267-71.
173. Sánchez E, Orozco G, López-Nevot MA, Jiménez-Alonso J, Martín J. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erithematosus. *Tissue Ant* 2004; 63:54-7.
174. Ma X, Liu Y, Gowen BB, Graviss EA, Clark AG, Musser JM. Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PLoS One* 2007; 12:e1318.
175. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, *et al.* Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169:10-4.
176. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, *et al.* Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002; 169:6668-72.
177. Chang S, Dolganiuc A, Szabo G. Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *J Leukoc Biol* 2007; 82:479–87.
178. Omuetti KO, Mazur DJ, Thompson KS, Lyle EA, Tapping RI. The polymorphism P315L of human toll-like receptor 1 impairs innate immune sensing of microbial cell wall components. *J Immunol* 2007; 178:6387-94.
179. Zhou J, Huang Y, Tian D, Xu D, Chen M., Wu H. Expression of toll-like receptor 9 in peripheral blood mononuclear cells from patients with different hepatitis B and C viral loads. *J Huazhong Univ Sci Technology Med Sci.* 2009; 20:313-7.
180. Wei XS, Wei CD, Tong YQ, Zhu CL, Zhang PA. Single nucleotide polymorphisms of toll-like receptor 7 and toll-like receptor 9 in hepatitis C virus infection patients from Central China. *Yonsei Med J* 2014; 55:428-34.
181. Rosen HR. Transplantation immunology: what the clinician needs to know for immunotherapy. *Gastroenterology* 2008; 134:1789-801.
182. Martínez OM, Rosen HR. Basic concepts in transplant immunology. *Liver Transpl* 2005; 11:370-81.

183. Gantier MP, Irving AT, Kaparakis-Liaskos M, Xu D, Evans VA, Cameron PU, *et al.* Genetic modulations of TLR8 response following bacterial phagocytosis. *Hum Mutat* 2010; 31:1069-79.